

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

**Determinación del volumen de agua corporal total por
dilución de agua tritiada**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Miguel Durán Sánchez

Madrid, 2015

R.915

DE 613 31
DUR

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

7A 1359

DETERMINACION DEL VOLUMEN DE AGUA CORPORAL

TOTAL POR DILUCION DE AGUA TRITIADA

José Miguel Durán Sánchez

Tesis para aspirar al Grado de
Doctor en Medicina y Cirugía.

Director: Prof. A. Gallego Fernandez



BIBLIOTECA U.C.M.



5307322373

Departamento de Fisiología y
Bioquímica.

Cátedra I de Fisiología.



Biblioteca
de Medicina

Es para mi una satisfacción expresar mi viva gratitud

Al Profesor Dr. Antonio Gallego Fernández, de cuyo ejemplo ha nacido mi vocación universitaria e investigadora y que me ha honrado con su magisterio y su amistad; sean estas líneas el testimonio de mi admiración y profundo agradecimiento.

Al Profesor Dr. Alberto Oriol Bosch, que guió mis primeros pasos en la experimentación fisiológica y ha seguido siempre mi trabajo con especial atención y cariño; esta tesis debe mucho a su ayuda y consejos.

A mis compañeros, Profesores Dres. Carlos Belmonte y Bernardo Marín, Dres. Enrique Aguilar, Margarita Barón, Juan José Jordá, Antonio de La Fuente, Julio César Legido, José Simón, Alicia Tejero y José Luis Zamorano, por su amistad y su ayuda.

A los Alumnos Internos de la Cátedra de Fisiología y especialmente a los Sres. Pablo Lobo, José Sánchez Criado y Rafael Alonso, por su colaboración en muchas de las tareas más ingratas de mi tesis.

A mi esposa, Margaret, cuyo estímulo es decisivo en mi trabajo y que tomó sobre sí la tediosa misión de mecanografiar la mayor parte de mi manuscrito.

A mi hermano Francisco Javier, por el tiempo y el esmero que ha empleado en la ejecución de las figuras y tablas.

A mis padres, por su ejemplo constante de honestidad y dedicación al trabajo.

INDICE GENERAL

CAPITULO PRIMERO: DETERMINACION DEL VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL POR DILUCION DE AGUA TRITIADA

1. Volumen de Agua Corporal Total: Métodos de Estimación y Valores Normales en el Hombre en Relación a Sexo y Edad

1.1. Métodos de Dilución

1.1.1. Dilución de Oxido de Deuterio

1.1.2. Dilución de Agua Tritiada

1.1.3. Dilución de Antipirina y sus Derivados

1.2. Métodos de Desecación

1.3. Gravedad Específica Corporal

1.4. Valores Normales de Agua Corporal Total en el Hombre

2. Distribución del Agua Corporal

2.1. Volumen Plasmático

2.2. Volumen de Líquido Intersticial y Linfático

2.3. Agua del Tejido Conectivo Denso, Cartílago y Hueso

2.4. Líquidos Transcelulares

3. Cinética de Distribución del Agua Tritiada en el Organismo

3.1. Absorción del Tritio por el Organismo

- 3.1.1. Absorción por via Gastrointestinal
- 3.1.2. Absorción por los Pulmones
- 3.1.3. Absorción a través de la Piel
- 3.1.4. Inyección en el Sistema Circulatorio
- 3.2. Distribución del Tritio en el Organismo y su Incorporación a los Constituyentes Orgánicos
 - 3.2.1. Intercambio entre los Líquidos Vasculares y Extravasculares
- 3.3. Excreción del Tritio del Organismo
- 3.4. Estimación del Volumen de Distribución del Agua Tritiada
- 3.5. Resumen de la Cinética de Distribución del Agua Tritiada en el Organismo
- 3.6. Toxicología del Tritio

CAPITULO SEGUNDO: TEORIA Y USO DE LOS TRAZADORES EN LA DETERMINACION DE VOLUMENES DE DISTRIBUCION Y TASAS DE TRANSFERENCIA INTERCOMPARTIMENTALES EN SISTEMAS BIOLOGICOS

- 1. Concepto de Trazador
 - 1.1. Historia
 - 1.2. Terminología
 - 1.3. Asunciones Básicas en la Cinética de Trazadores
- 2. Análisis Compartimental: Cálculo de Volúmenes de Distribución y Tasas de Transferencia Intercompartimental en algunos Sistemas Compartimen

tales Simples

- 2.1. Símbolos
 - 2.2. Sistema Bicompartimental Cerrado
 - 2.3. Sistema Abierto de un Compartimento
 - 2.4. Sistemas Tricompartimentales y Multicomparti_
compartimentales
 - 2.5. Sistemas Abiertos: Sistema Bicompartimental
Abierto, Mamilar o Catenario
-
3. Desarrollo de un Modelo Teórico Compartimental
a partir de los Datos Observados sobre el Com_
portamiento de un Trazador en un Sistema Bioló_
gico
- 3.1. Ajuste de Ecuaciones Exponenciales a las Ob_
servaciones Experimentales
 - 3.2. Medición del Volumen de Distribución
 - 3.3. Aplicación de los Computadores Electrónicos:
Analógicos y Digitales

CAPITULO TERCERO: FUNDAMENTOS DE ESPECTROMETRIA DE CENTELLEO LIQUIDO

1. Principios Operativos
 2. Radioactividad de Fondo
- 2.1. Radioisótopos Naturales en los Materiales
Usados para el Contaje, en los Viales o en
la Muestra
 - 2.2. Radiación Cósmica

2.3. Fosforescencia

2.4. Ruido Térmico de los Tubos Fotomultiplicadores

3. Eficiencia de Contaje

3.1. Fracción de la Energía de la Partícula Absorbida por la Mezcla de Centelleo

3.2. Eficiencia de Conversión de la Mezcla de Centelleo

3.3. Acoplamiento Espectral entre la Mezcla de Centelleo y los Fototubos

3.4. Temperatura de la Muestra

3.5. Volumen de la Muestra

3.6. Eficiencia de Captación de la Luz Emitida

3.7. Eficiencia de Conversión del Cátodo del Tubo Fotomultiplicador

3.8. Factores de Amplificación

3.9. Posición de los Discriminadores

3.10. "Apagamiento" de la Luz Emitida

4. Métodos de Determinación del Grado de Apagamiento y la Eficiencia de Contaje

4.1. Standardización Interna

4.2. Cociente de Canales

4.3. Standardización Externa

5. Mezclas de Centelleo

5.1. Solventes

5.2. Solutos Primarios

8.

5.3. Solutos Secundarios

6. Preparación de Muestras

CAPITULO CUARTO: MATERIAL Y METODOS

MATERIAL

1. Equipo

1.1. Contadores de Centelleo Líquido

1.2. Sistema de Cálculo de Eficiencias de Contaje

Compuesto por:

1.3. Centrifuga

1.4. Balanzas

1.5. Sistema de Destilación en Vacío

1.6. Jeringuillas

1.7. Pipetas

2. Agua Tritiada

3. Solventes y Solutos

4. Viales

5. Sujetos y Animales de Experimentación

METODOS

1. Condiciones de Contaje

2. Determinación de la Eficiencia

3. Preparación de Standards de Apagamiento

4. Mezclas de Centelleo

4.1. Solubilidad de la Orina en la Mezcla de Centelleo de Butler

4.2. Determinación Experimental de la Composición Optima de la Mezcla de Centelleo

4.2.1. Efecto de la Concentración de PPO y de Dimetil-POPOP sobre la Eficiencia de Contaje

4.2.2. Efecto de la Concentración de Naftaleno sobre la Eficiencia de Contaje

4.3. Comparación de Distintas Mezclas de Centelleo para la Determinación de Tritio en Muestras Biológicas

5. Preparación de Muestras

5.1. Plasma: Precipitación y Filtración

5.2. Orina: Decoloración

5.3. Destilación en Vacío

5.3.1. Prueba de Fraccionamiento isotópico durante la Microdestilación en Vacío

6. Determinación del Agua Corporal Total en Humanos

6.1. Preparación de las dosis inyectables de HTO

6.2. Determinaciones del Agua Corporal en Humanos

6.3. Determinación del Peso Corporal Magro

6.4. Estudio de la Cinética de Distribución del Agua Tritiada en el Gato

Apéndice A

Apéndice B

CAPITULO QUINTO: RESULTADOS

1. Elección de las Condiciones de Contaje y Determinación de la Eficiencia
2. Mezclas de Centelleo
3. Preparación de Muestras
4. Determinación del Volumen de Agua Corporal Total en Humanos
5. Cinética del Agua Tritiada en Plasma y Orina en el Gato

CAPITULO SEXTO: DISCUSION Y CONCLUSIONES

1. Metodología
- 2.
2. Cinética del Agua Corporal en el Organismo

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS.-

- Figura 1 Distribución del Agua Corporal en el Hombre
- Figura 2 Sistemas multicompartimentales; a: Sin
 Restricciones b: Restringidos
- Figura 3 Sistema Bicompartimental Cerrado
- Figura 4 Solución Gráfica del Sistema Bicomparti_
 mental Cerrado
- Figura 5 Evolución de la Concentración de un Tra_
 zador en un Sistema Abierto de Un Compar_
 timento
- Figura 6 Evolución de las Concentraciones de un Tra_
 zador en un Sistema Tricompartimental Ce_
 rrado
- Figura 7 Sistema Bicompartimental Abierto Mamilar
 y su Solución
- Figura 8 Sistema Bicompartimental Abierto Catenario
 y su Solución
- Figura 9 Sistema Bicompartimental Abierto por los
 dos Compartimentos
- Figura 10 Análisis Gráfico de una Curva Triexponen_
 cial
- Figura 11 Efecto del Aclaramiento en un Sistema Bi_
 compartimental Abierto, sobre la Estimación
 del Volumen de Distribución

- Figura 12 Análogos Eléctricos de Sistemas Compartimentales Biológicos
- Figura 13 Solución de varios Sistemas Compartimentales con un Computador Analógico
- Figura 14 Solución de varios Sistemas Compartimentales con un Computador Digital
- Figura 15 Relación entre el Voltaje Aplicado y la Carga en el Anodo en un Contador Tipo Geiger-Müller
- Figura 16 Espectro de Emisión del Tritio
- Figura 17 Diagrama de Bolques del Contador de Centelleo Líquido Tri-Carb 314-AX (Packard Instruments Co.)
- Figura 18 Efecto del Apagamiento en la Muestra sobre el Espectro de Pulsos a la Salida de un Discriminador en un Contador de Centelleo Líquido
- Figura 19 Espectros de Emisión de los Solutos más Usados
- Figura 20 Frasco de Microdestilación para Destilación en Vacío de Agua Tritiada a partir de Muestras Biológicas
- Figura 21 Efecto del Alto Voltaje aplicado a los Fototubos y de la Amplitud de Ventana sobre la Cifra de Mérito para Tritio
- Figura 22 Relación entre Eficiencia de Contaje para Tritio y Cociente de Canales en el Contador Tri-Carb 314-AX

- Figura 23** Relación entre Eficiencia de Contaje para Tritio y Cociente de Canales en el Contador Mark II
- Figura 24** Relación entre Eficiencia de Contaje para Tritio y Cociente de Canales para el Standard Externo en el Contador MarkII
- Figura 25** Relación entre Eficiencia de Contaje para Tritio y Cociente de Canales para los Standards de Apagamiento con Agua y con Piridina
- Figura 26** Relación entre la Concentración de PPO en la Mezcla de Centelleo y las CPM de Tritio
- Figura 27** Relación entre la Concentración de Di₂metil-POPOP en la Mezcla de Centelleo y las CPM de Tritio
- Figura 28** Relación entre la Concentración de Naf₂taleno en la Mezcla de Centelleo y las CPM de Tritio
- Figuras 29 a 38** Cinética del Agua Tritiada en el Hombre. Evolución de la actividad Específica de Tritio en Plasma y Orina con el tiempo transcurrido tras la Inyección
- Figuras 39 a 42** Cinética del Agua Tritiada en el Gato: Evolución de la Actividad Específica de Tritio en Plasma y Orina con el Tiempo Transcurrido tras la Inyección

- Figuras 43 a 46 Cinética del Agua Tritiada en el Gato:
Evolución de la Actividad Específica de
Tritio en Plasma, Orina y LCR con el
Tiempo Transcurrido tras la Inyección
- Figura 47 Evolución de la Actividad Específica de
Tritio en Plasma y Orina con el Tiempo
Transcurrido tras la Inyección en un
Perro Tratado con un Diurético inhibi_
dor de la Anhidrasa Carbónica

TABLAS.-

- Tabla 1 Volumen de Agua Corporal Total en el
Hombre Estimado por Dilución de D₂O
- Tabla 2 Volumen de Agua Corporal Total en el
Hombre Estimado por Dilución de HTO
- Tabla 3 Volumen de Agua Corporal Total en el
Hombre Estimado por Dilución de Antipi_
rina y sus Derivados
- Tabla 4 Volumen de Agua Corporal Total en el
Hombre Estimado por Desecación de Ca_
dáveres
- Tabla 5 Volumen de Distribución de los Sacári_
dos en el Hombre
- Tabla 6 Contenido de Agua del Hueso, Cartílago,
Tendón y Piel en el Hombre y Animales

Tabla 7	Volumen de Agua Transcelular
Tabla 8	Solubilidad de la Orina en la Mezcla de Centelleo de Butler
Tabla 9	Preparación de Muestras: Plasma
Tabla 10	Preparación de Muestras: Orina
Tabla 11	Prueba de Fraccionamiento Isotópico durante la Destilación en Vacío
Tabla 12	Comparación de las Eficiencias de Contaje Obtenidas con Diversas Mezclas de Centelleo para Muestras Biológicas
Tabla 13	Comparación de las Eficiencias de Contaje Obtenidas con la Mezcla de Centelleo "Y" de White para Muestras Biológicas con y sin Destilación en Vacío Previa
Tabla 14	Características Antropométricas de los Sujetos
Tabla 15	Comparación de los Parámetros de las Curvas de Actividad de HTO en Plasma y Orina
Tabla 16	Volumen de Agua Corporal Total y Vida Media Biológica del HTO
Tabla 17	Comparación de los Parámetros del Ultimo Término Exponencial de las Curvas de Actividad de HTO en Plasma, Orina y LCR

CAPITULO PRIMERO.-

DETERMINACION DEL VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL
POR DILUCION DE AGUA TRITIADA

1. VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL: METODOS DE ESTIMACION
Y VALORES NORMALES EN EL HOMBRE EN RELACION A SEXO
Y EDAD.-

Las principales determinaciones del contenido de agua corporal total en el hombre fueron realizadas en el siglo XIX mediante la desecación de cadáveres a temperatura constante. Una de las primeras estimaciones fué publicada por Bischoff (1863), obteniendo un valor igual a un 58,5% del peso corporal del cadáver. Volkmann (1881) y Michel (1900) realizaron también estimaciones consiguiendo valores muy similares a los obtenidos con la metodología actual.

Sin embargo, por muy precisos que fueran los resultados obtenidos con estos métodos, su interés era relativo, dada la imposibilidad de su aplicación clínica. Por ello, el auge de los estudios sobre composición corporal entre los años 40 y 60, y el reconocimiento progresivo de la importancia de las alteraciones del agua y los electrolitos en diversos capítulos de la Patología, trajo consigo la búsqueda de procedimientos indirectos para estimar el contenido de agua corporal en sujetos vivos, disponiéndose actualmente de una serie de métodos que podemos agrupar bajo tres encabezamientos: Estudios de Desecación de Cadáveres, Métodos de Dilución de Trazadores y Determinaciones a partir de la Gravedad Específica Corporal.

En el curso de esta Introducción vamos a considerar casi

exclusivamente los métodos de dilución de trazadores puesto que los métodos de desecación, con sus obvias limitaciones, y las determinaciones a partir de la gravedad específica, difícil de medir con exactitud, prácticamente dejaron de ser utilizados a partir del momento en que se dispuso de trazadores adecuados para la medición del agua corporal (Moore y cols, 1963).

1.1. Métodos de Dilución

El Principio de Dilución fué usado por primera vez en el estudio de la composición del organismo por Keith, Rowntree y Geraghty (1915), utilizando un colorante rojo para medir el volumen plasmático.

Aunque en el Capítulo Segundo estudiaremos con algún detalle el fundamento de los métodos de dilución de trazadores, podemos decir aquí que esencialmente comprende los siguientes pasos:

- a) Inyección de una cantidad conocida de una sustancia denominada trazador.
- b) Mezcla del trazador con la sustancia cuya masa o volumen queremos determinar (El volumen de agua corporal total en nuestro caso)
- c) Análisis de una muestra de la sustancia y determinación del trazador en ella, a partir de la cual podremos calcular el volumen o la masa en la que la dosis

trazador administrada se ha distribuido

El problema básico encontrado para aplicar los métodos de dilución fué el de hallar un trazador ideal que cuando fuera introducido en el cuerpo permitiera una medición segura y exacta del Agua Corporal Total. Tal trazador debía cumplir estas condiciones: carecer de toxicidad para el organismo: equilibrarse rápidamente con toda el agua corporal, intra y extracelular; no ser depositado o excretado selectivamente; no ser metabolizado o, al menos, no demasiado rapidamente; ser susceptible de un análisis exacto en presencia de otros constituyentes del plasma, la orina, o cualquier otro líquido biológico del que se recogiesen las muestras.

1.1.1. Dilución de Oxido de Deuterio

Uno de los primeros trazadores ensayados fué el Oxido de Deuterio, introducido por Hevesy y Hofer (1934). El Deuterio es un isótopo estable del hidrogeno, de masa atómica dos, que se encuentra en la naturaleza mezclado con el hidrogeno de masa atómica uno (Protio) en la relación de 15 partes de Deuterio por 100.000 partes de Protio. Cuando el Deuterio se combina con el oxígeno para formar óxido de Deuterio (D_2O) se obtiene una molécula de peso molecular 20. El óxido de Deuterio tiene una gravedad específica aproximadamente 11% mayor que la del agua pura y es esta diferencia física en densidad, la propiedad que ha sido más

ampliamente usada para medir el contenido en Deuterio del agua en investigación biológica (Pinson, 1952). Cuando se mezcla con el agua (H_2O), el Deuterio en el Oxido de Deuterio (D_2O) se intercambia facilmente con el hidrógeno en el agua (H_2O) y por tanto, en soluciones diluídas de D_2O una obtiene el Deuterio principalmente en una molécula representada por el símbolo HDO o agua deuterada (Siri, 1949) de peso molecular 19. Siri (1949) y Kirshenbaum (1951) han publicado comparaciones detalladas de las propiedades físicas del D_2O y H_2O y de las mezclas de estas dos aguas.

Tras el trabajo de Hevesy y Hofer (1934) fueron apareciendo en años sucesivos estimaciones del Volumen de Agua Corporal Total en humanos utilizando el Oxido de Deuterio como trazador. Moore (1946), Hollander y cols., (1949), Soberman y cols., (1949), Hardy y cols., (1951), Hurst y Sherum (1951), Schloerb y cols., (1951), Deane (1952), Edelman (1952), Edelman y cols. (1952 a, b,) Faller y cols. (1952), Haley y Woodbury (1952), Moore (1952), Schwartz y cols. (1952), Hutchinson y cols. (1954), Faller y cols. (1955), Moore (1956), Friis-Hansen (1957), Edelman y cols. (1958), por citar los más importantes.

Los métodos usados para determinar el Deuterio en el agua destilada de las muestras biológicas fueron, principalmente; el método de la "gota que cae" (Falling drop method) (Schloerb y cols., 1951), la espectrometría de masas (Solomon y cols., 1950), la espectrofotometría infraroja (Thor-

ton y Condon, 1950) y la determinación del punto de congelación (Reaser y Burch (1958).

La Tabla 1 tomada del "Handbook of Blood and other Biological Fluids" (Altman y Dittmer, eds., 1961) recoge los valores hallados con el uso del Oxido de Deuterio como trazador, para el Volumen de Agua Corporal Total en el hombre, en relación con sexo y edad.

1.1.2. Dilución de Agua Tritiada

El agua tritiada fue introducida como trazador por Pace y colaboradores en 1947. El Tritio es el isótopo radioactivo del hidrógeno de masa tres, tiene una Vida Media de 12,26 años y decae a Helio emitiendo una partícula Beta de poca penetración y una energía máxima de 18,5 kev (Slack y Way, 1959). No emite radiación gamma y consecuentemente no representa ningún peligro radiológico en tanto que se evite su entrada en el organismo. La Radioactividad del Tritio es su característica más importante desde el punto de vista de su determinación en muestras biológicas, como veremos más adelante.

Previniedo alguna posible confusión por el uso de los términos Agua Deuterada (D_2O), Agua Tritiada (HTO), Oxido de Deuterio (D_2O) y Oxido de Tritio (T_2O) diremos que, cuando se usa el Deuterio como trazador, el agua inyectada consis_

TABLE 1

VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL EN EL HOMBRE
ESTIMADO POR DILUCION DE OXIDO DE DEUTERIO

Subjects		Total Body Water ml/kg body weight	Reference
Specification	No.		
(A)	(B)	(C)	(D)
Deuterium Oxide			
1	Premature birth	131 ¹	(702-830) ^{c2}
2	Newborn	9	757(703-811)
3	0-1 da	61	790(638-842)
4	1-10 da	91	740(700-780)
5	1-3 mo	71	723(679-767)
6	1 mo-1 yr	9	626(509-745)
7	3-6 mo	51	701(651-751)
8	6 mo-1 yr	81	604(570-638)
9	6 mo-11 yr	111	(532-628) ^{c2}
10	1-2 yr	51	587(545-629)
11	1-9 yr	11	589(548-630)
12	2-3 yr	91	635(601-669)
13	3-5 yr	51	622(578-666)
14	5-10 yr	41	615(565-665)
15	10-16 yr	151	580(556-604)
16		9 ^d	590(516-664)
17		6 ^d	562(489-633)
18	17-39 yr	45 ^d	602(502-702)
19	18-32 yr	17 ^d	618(559-702) ^c
20	20-31 yr	11 ^d	519(456-599) ^c
21		18 ^d	512(456-599) ^c
22	35-54 yr	10 ^d	554(447-641) ^c
23		6 ^d	482(405-543) ^c
24	<40 yr	19 ^d	511(430-592)
25	>40 yr	10 ^d	468(389-547)
26	40-59 yr	14 ^d	572(471-673)
Tritium Oxide			
27	>60 yr	3 ^d	541(478-628) ^c
28	Adult		630
29			624 ³
30		47 ^d	598(420-720) ^c
31		13 ^d	510(420-599) ^c
32		33 ^d	612
33	<60 kg	16 ^d	503(413-593)
34	>60 kg	15 ^d	486(395-577)
35	<70 kg	37 ^d	626(517-735)
36	>70 kg	42 ^d	560(470-650)
37	Pregnant		
38	2nd trimester	6	547(485-600) ^c
39	3rd trimester	6	544(487-592) ^c
40	3rd trimester	3	527(503-557) ^c
41	Postpartum	6	520(437-581) ^c
42	20-25 yr	4 ^d	603(575-630)
43	23-49 yr	13 ^d	607(511-703)
44	34-56 yr	15 ^d	521(479-567)
45	Adult		647

te en un 99,5% (Leibman y cols., 1960) de Oxido de Deuterio (D_2O) y solo después de su dilución en el agua o líquidos corporales, se convierte en Agua Deuterada o DHO. Sin embargo, cuando el trazador es Tritio, solo una pequeña cantidad de esta está presente en el agua inyectada, siendo esta por tanto Agua Tritiada (HTO). Un miligramo de T_2O puro, si fuera posible obtenerlo, contendría aproximadamente 3 Curios de Tritio ($1 \text{ Curio} = 3,7 \times 10^{10} \text{ Dpm}$).

Después del trabajo original de Pace y cols. (1947) se sucedieron una serie de determinaciones de Volumen de Agua Corporal Total utilizando Agua Tritiada como trazador, pudiendose citar entre los más importantes los de Pinson y Anderson (1950), Prentice y cols. (1952). Langham y cols. (1956), Fallot y cols. (1957), Pinson y Langham (1957), Birkenfeld y cols (1958), Cooper (1958), Foy y Schnieden (1960), Laibman (1960), Richmond y cols. (1960), (1962), Foy (1964), Paerichs (1964) Degrossi (1965), Leonard y cols (1965), Gundersen y Shan (1966), McTaggart y Cardús (1968), Moore (1968), Cardús y cols. (1969), y Owan y cols. (1969), en humanos, y Pace y cols. (1947), Thompson (1952,1953), Raid (1958), Richmond y cols. (1960), Hansard (1964), y Aschbacher (1965) en animales.

En la Tabla 1 se encuentran recogidos algunos de los valores obtenidos con este procedimiento para el Volumen de Agua Corporal Total, habiendo nosotros completado la rela_

ción con los datos recogidos en la Tabla 2.

1.1.3. Dilución de Antipirina y sus Derivados

Soberman y sus asociados (1949) utilizaron por primera vez la Antipirina (AP) como trazador para el Agua Corporal. Estos observadores demostraron que, tras la inyección, la Antipirina se distribuye homogéneamente por toda el Agua Corporal y que su concentración en los líquidos corporales puede ser determinada con razonable exactitud por espectrofotometría. Asimismo, encontraron que los valores obtenidos con la Antipirina guardan bastante relación con los obtenidos con Oxido de Deuterio (Soberman y cols., 1949). Brodis y colaboradores (1951) iniciaron el empleo de algunos derivados de la Antipirina, susceptibles de una determinación más exacta, la N-Acetil-4-Aminopirina (NAAP) y la 4-Iodo-Antipirina (4-IAP) (Talso y cols., 1955) que, sin embargo, han tenido menos uso. La Tabla 3, tomada de Altman y Dittmer (1961) recoge los resultados de las determinaciones de Volumen de Agua Corporal Total con Antipirina y sus derivados, publicadas por: Messinger y Steele (1949), Soberman y cols. (1949), Berger y cols. (1950), Brodie y cols. (1951), Hurst y Sherum (1951), Deane (1952), Ikkos y cols. (1954), Faller, y cols. (1955), Talso y cols. (1955), Grunner (1957), y Reid y cols. (1958).

TABLA 2

VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL EN EL HOMBRE ESTIMADO POR DILUCION DE AGUA TRITIADA

Nº Sujetos	SEXQ	AGUA CORPORAL★	REFERENCIA
1	V	647	Pace y cols., 1947
8	V.H	570	Pinson y Anderson, 1951
15	V.H	521	Prentice y cols., 1952
9	H	580	Fallot y cols., 1957
11	V	610	Fallot y cols., 1957
5	V	622	Pinson y Langham, 1957
37	V	560	Boling y Bols., 1959
12	V	510	Vaugham y Boling, 1959
10	V	708	Foy y Schnieden, 1960
14	V	557	Leonard y cols., 1965
36	V.H	583	Gundersen y Shen, 1966
7	V	642	Cardus y cols., 1969

★ ml./ kg. Peso Corporal

1.2. Métodos de Desección

Por último, para completar los datos ofrecidos sobre el Volumen de Agua Corporal Total en el hombre en relación con la edad y el sexo, presentamos en la Tabla 4 los datos recogidos por Altman y Dittmer (1961) sobre los estudios más importantes realizados utilizando métodos de Desección: Bischoff (1863), Voldman (1981), Michel (1900), Camerer y cols (1902), Klose (1914), Langstein y Edelstein (1917), Eivens y Macy (1933), Iob y Swanson (1934), Mitchell y cols. (1945), Friis-Hansen y cols. (1951), Widdowson y Spray (1951), Widdowson y McCance (1951).

1.3. Gravedad Específica Corporal

El método de estimación del Volumen de Agua Corporal Total basado en la determinación de la Gravedad Específica Corporal se inició a partir de los estudios de Behnke (1941) midiendo la Gravedad Específica en hombres jóvenes. Mostró que en sujetos normales la determinación de la Gravedad Específica Corporal hacía posible la estimación del Contenido de Grasa Corporal, ya que la grasa, con su baja gravedad específica (0,92) fué identificada como la variable primaria que determinaba la densidad corporal.

Partiendo de estos hallazgos, Behnke formuló su ampliamente aceptado concepto del Peso Corporal Magro, concibiendo el cuerpo como consistente de una porción libre de grasa de

TABLA 3

VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL EN EL HOMBRE
ESTIMADO POR DILUCION DE ANTIPIRINA Y SUS DERIVADOS

	Subjects		Total Body Water ml/kg body weight	Reference	Subjects		Total Body Water ml/kg body weight	Reference
	Specifi- cation	No.			Specifi- cation	No.		
	(A)	(B)	(C)	(D)	(A)	(B)	(C)	(D)
1	Newborn	5	754(647-861)	8	13	60-79 yr	422	14, 16
2	Newborn-6 mo		(720-830) ^c	7	14	>80 yr	488	14, 16
3	6 mo-11 yr		(530-630) ^c	7	15	Adult	(393-579) ^c	15
4	1-12 mo	8	627(504-750)	8	16		557 ³	10
5	1-10 yr	8	569(491-647)	8	17		497(487-507)	11
6	18-46 yr	81 ^d	611(430-729) ^c	12	18		549	9
7	17-39 yr	23 ^d	548	1-3, 5, 13-16	19		506(470-542) ⁴	17
8	20-39 yr	18 ^d	444	14, 16	20		506(480-532) ⁵	17
9	26-65 yr	16 ^d	497(463-531)	17	21		585	6
10	40-59 yr	31 ^d	545	1-3, 5, 13-16	22		527(403-682) ^c	8, 16
11	40-59 yr	4 ^d	446	14, 16	23		446(292-528) ^c	8, 16
12	>60 yr	18 ^d	516	1-3, 5, 13-16	24	<70 kg	559(450-668)	1, 16
					25	>70 kg	549(435-663)	1, 16

/1/ Navy personnel. /2/ Number of observations. /3/ Edematous subjects. /4/ 4-Iodo-antipyrine. /5/ N-Acetyl-4-amino-antipyrine.

TABLA 4

VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL EN EL HOMBRE ESTIMADO POR DESECACION DE CADAVERES

Subjects		Total Body Water		Reference	
Specification	No.	ml/kg	body weight		
(A)	(B)	(C)	(D)		
Desiccation					
Fetus					
1 <100 g	33	914(871-957)	6,8,9,13,15		
2 100-499 g	36	882(837-927)	6,8,9,13,15,20		
3 500-999 g	14	852(792-912)	6,9,11,13,15,18,20		
4 1000-1499 g	10	832(798-866)	6,8,9,11,13,18		
5 1500-2499 g	10	783(710-856)	4,5,6,9,20		
6 Fetus or newborn, >2500 g	17	708(598-818)	3,5,6,9,10,13,20		
7 Newborn		740	7		

Subjects		Total Body Water		Reference	
Specification	No.	ml/kg	body weight		
(A)	(B)	(C)	(D)		
Desiccation (concluded)					
8 Newborn		796	7		
9 (concluded)		664	7		
10 Adult		679	14		
11		676	2		
12	4d	635	3,14,17,19		
13	1g	560	19		
14	5	648(580-678)c	1,14,16		
Specific Gravity					
15 Adult	9	543(444-596)c	12		

composición esencialmente constante, y de una cantidad va
riable de grasa.

Behnke no estuvo interesado primariamente en determinar valores para el Agua Corporal Total en sus sujetos; pero, basándose en la relación recíproca entre grasa y agua cor
poral (Steele, 1950) esto es, que mientras menor es el con
tenido de grasa, mayor es el porcentaje de agua en el cuer
po, Messinger y Steele, (1949), Steele (1950), Osserman y cols. (1950), Hardy y Drabkins (1950), Cheek y cols. (1966) y Early y cols. (1970) han estimado el Volumen de Agua Cor
poral en adultos y niños obteniendo valores similares a los ya apuntados. Sin embargo, como más adelante veremos, el método se ha empleado primariamente para determinación del Peso Corporal Magro y el Porcentaje de Grasa Corporal.

1.4. Volumen de Agua Corporal Total en el Hombre

Los datos presentados en las Tablas 1, 2, 3, y 4, sumari_ zando las estimaciones del Volumen de Agua Corporal a tra_ vés de distintos procedimientos, muestran en primer lugar una aparente tendencia a la disminución progresiva del Vo_ lumen de Agua Corpòral al aumentar la edad del individuo, confirmando las primeras observaciones de Edelman y cols. (1952) y Friis-Hansen (1957). Este último ha publicado un análisis detallado de las relaciones entre agua corporal y edad, peso corporal, altura y superficie corporal.

En los mismos datos aparece también una diferencia significativa entre los Volúmenes Medios de Agua Corporal Total de varones y hembras siendo menores en estas. Esta diferencia aparece en la pubertad (Edelson y Leibman, 1959) y se mantiene como una característica sexual durante el resto de la vida (Friis-Hansen, 1957).

Sin embargo, hemos de tener en cuenta que los resultados recogidos en las Tablas 1, 2, 3, y 4 están expresados en términos de mililitros de Agua Corporal/kilogramo de Peso Corporal Total. La evidencia actual, basada en el estudio de Keys y Brozek (1953) sobre la grasa corporal en el hombre, indica que las diferencias estadísticas encontradas entre los contenidos de Agua Corporal, expresados como una fracción del Peso Corporal, en adultos con respecto a la edad y al sexo son primariamente una consecuencia de diferencias en el contenido de grasa corporal (Edelman y Liebman, 1959; Early y cols., 1970).

Hemos dicho que Behnke (1941) sobre una base teórica propuso que los contenidos de Agua y Grasa Corporales deberían estar inversamente relacionados, al ser la grasa corporal relativamente anhidra (Aproximadamente 20% de agua, Keys y Brozek, 1953). Hardy y Drabkin (1950) probaron esta relación en un estudio sobre un grupo seleccionado de varones y hembras adultos sanos, oscilando en tamaño corporal desde muy delgados a muy obesos. El Agua Corporal Total (estimada

por dilución de D_2O) para el varón más delgado fué un 71% del peso corporal y para el más obeso de un 42%. Similarmente la hembra más delgada tuvo un contenido de Agua Corporal Total de 68% del peso corporal y la más obesa (aunque no tan obesa clínicamente como el varón más obeso) tuvo un 50% del peso corporal total.

En estudios posteriores, Osserman y cols (1950) y Hardy y cols (1951) encontraron iguales resultados. Sobre esta base, Hardy y Drabkin (1952) propusieron el uso del concepto del Peso Corporal Magro en la expresión del contenido de Agua Corporal Total. Schloerb y cols. (1950) encontraron que el Agua Corporal Total presentaba una mejor correlación con la superficie corporal y el consumo de oxígeno que con otros índices físicos examinados. Por ello Hardy y Drabkin (1952) consideraron que aunque sería erróneo asumir que la frasa es metabólicamente inactiva, probablemente sería más activo el Peso Corporal Magro, y esta, tomado como Peso Corporal Ideal podría ser usado como base para comparar tanto tasas metabólicas como componentes corporales.

Sin embargo esta propuesta ha sido raramente atendida, haciendo difícil y arriesgando comparar las distintas estimaciones publicadas del contenido de Agua Corporal Total, (Moore y cols., 1963; Novak, 1967). Aunque se han publicado diversos procedimientos simplificados para la predicción de la Grasa Corporal, basados principalmente en mediciones

antropométricas (Porozeck y Keys, 1951; Behnke, 1963; Wilmore y Behnke, 1968) o del pliegue cutáneo (Brozek, 1961; Rauh y Schumsky, 1968), no han sido utilizados salvo excepciones (Siri, 1956; Cardús y cols., 1969) en las estimaciones del agua corporal, sino únicamente dentro del contexto de estudios sobre la grasa corporal.

Hay sin embargo un caso en que un contenido bajo de Agua Corporal Total no está relacionado con un alto porcentaje de Grasa Corporal, Friis-Hansen (1957) reportó la disminución en el Contenido de Agua Corporal observada durante el primer año de la vida del niño está originada primeramente por una disminución en el contenido líquido de los espacios Plásmatico e Intersticial.

Gundersen y Shan (1966) han publicado más recientemente un estudio sobre la relación entre el volumen de Agua Corporal Total (estimada por Dilución de Agua Tritiada) y el Grado de Obesidad, mostrando una relación lineal inversa entre el grado de exceso de peso y el volumen de agua corporal, excepto en casos de extrama obesidad donde aparece haber un cierto grado de retención de agua. Con una orientación similar, Owens y cols. (1969) han estudiado la relación entre cambios en el Peso y el Agua Corporales a lo largo de 4 semanas en un grupo de adultos de ambos sexos.

Seitchick y cols. (1963), con Agua Tritiada, y Haley y

cols. (1952). Seitchick (1967) y Hytten y Thomson (1968) con Oxido de Deuterio, han estudiado la variación del contenido de Agua Corporal durante el embarazo, encontrando una ganancia total de agua de 7,6 a 8,5 litros que se encuentran distribuída basicamente entre el feto, placenta, líquido amniótico, y el aumento en volumen plasmático.

No vamos a referirnos aquí, por exceder los objetivos de esta tesis, a las alteraciones del contenido de Agua Corporal en los estados patológicos, cuyo estudio fué iniciado por Moore (1952), en enfermos con procesos agrupados bajo los encabezamientos generales de Pérdidas o Ganancias de Agua, y Prentice y colaboradores (1952), en enfermos con Insuficiencia Cardíaca Congestiva y Cirrosis Portal.

Bland (1963) ha editado un excelente estudio sobre el metabolismo clínico del agua y los electrolitos, en el que se consideran las repercusiones que sobre el contenido corporal de agua electrolitos tienen una serie de enfermedades Cardiocirculatorias, Renales, o Metabólicas. Kleeman y Fichman (1967) han recogido un amplio número de referencias de interes para profundizar en este apartado.

2. DISTRIBUCIÓN DEL AGUA CORPORAL.-

A medida que se ha dispuesto de una información más detalladas, los conceptos de la organización del agua corporal se han hecho más complejos, habiendo cambiado considerable

mente las ideas sobre la anatomía de los fluidos y electrolitos corporales en las últimas décadas. (Edelman y Leibman, 1959; Moore y cols 1963; Cleland y cols, 1966

Estas ideas han estado influenciadas por las limitaciones de las técnicas de estudio tanto como por las bases conceptuales anatómicas en que se fundaron.

La demostración de las membranas celulares condujo al concepto de que el agua corporal podría ser descrita adecuadamente como distribuida en dos fases, la extracelular y la intracelular (Deane, 1951; Edelman, 1952). La existencia de límites celulares definidos y las diferencias en concentraciones de electrolitos (Hastings, 1941; Gamble, 1951; Graham y cols, 1967; Baron y Ahmed, 1969), justifican tal distinción especialmente debido a que la actividad celular y la supervivencia del organismo depende del mantenimiento de la constancia de la distribución de electrolitos en el agua intra y extracelular (Bland, 1963).

Al extrapolar los resultados obtenidos a partir del análisis de tejidos, esta hipótesis original fue ampliada a una distribución en tres compartimentos: plasma, líquido intersticial y líquido intracelular (Hastings, 1941; Manery y Hastings, 1939), siendo muy similar la composición electrolítica del plasma a la del líquido intersticial (Pappenheimer y cols, 1951; Manery, 1954), pero muy diferente a la del líquido intracelular, (Deane 1951) caracterizada por un predominio de potasio, magnesio fosfato y proteínas

(Hastings, 1941; Wallace, 1952; Passmore y Drapen, 1964; Flear y cols, 1968).

Este esquema representaba la ventaja de hacer posible definir la composición intracelular a partir de observaciones en el plasma de estimaciones del líquido total extracelular realizadas por un método adecuado (Edelman y Leibman, 1959).

Esta posibilidad de definir anormalidades de la distribución del agua y los electrolitos a ambos lados de la membrana celular en el hombre "in vivo" originó una intensa búsqueda de una sustancia adecuada para medir el líquido extracelular total (Moore, 1946; Krumhoffer, 1946; Overman, 1951).

La evidencia de que el colro es casi exclusivamente extracelular en el músculo esquelético condujo a su uso para medir el volumen extracelular (Hestings, 1941). Otros aniones análogos, incluyendo el bromo, el tiocianato, tiosulfato, sulfato y ferrocianuro, tanto en formas estables como isotópicas fueron usadas para este fin (Crandall y Anderson, 1934; Brodie y cols., 1939; Laviatas y cols, 1936; Gilman y cols., 1946; Calcagno y cols., 1951; Walser, 1952; Kavalier, 1956; Howe y Ekius, 1963) también para evitar la objeción de la permeabilidad (Barrat y Walsa, 1968, 1969). de las células a los iones se introdujeron los sacaridos,

manitol, sucrosa e inulina (Lavieta y cols., 1936; Newman y cols, 1944; Kruhoffer, 1946; Gaudino y cols, 1948; Bojesen, 1952; Addauki, y cols. 1967; Soudergaard y Srrande, 1970)

En todos estos estudios se realizaron dos asunciones:

1) El líquido extracelular existía en un estado homogéneo y por lo tanto podía medirse por el volumen de dilución en una sola sustancia.

2) Las alteraciones patológicas no afectarían a la homogeneidad de esta fase (Edelman y Leibman, 1959; Edelman y cols., 1954; Bergstrom y Wallace, 1954; Sweet, Nadell y Edelman, 1957; Gotch, Nadell, y Edelman, 1957).

Posteriormente se demostró la falsedad de la primera y más importante de estas dos asunciones, encontrándose que la fase extracelular era heterogénea en una serie de estudios sobre los contenidos de agua y electrolitos del tejido óseo (Edelman y cols, 1954; Bergstrom y Wallace, 1954; Passmore y Draper, 1964) conectivo denso y lumen gastrointestinal (Sweet, Nadell y Edelman, 1957; Gotch, Nadell y Edelman, 1957). Antes de estas observaciones, parecían existir diferencias irreconciliables entre las concentraciones y contenidos totales de electrolitos intracelulares estimadas a partir de análisis de tejidos, y las calculadas de los estudios de dilución de trazadores; (Litchfield y Gadie, 1958)

diferencias que provenían de la asunción realizada en los estudios de dilución de la identidad de los volúmenes de distribución de la sucrosa y la inulina con el volumen de líquido extracelular (Gaudino y cols, 1948; Edelman y Leibman, 1959).

Esta asunción errónea, asignaba parte del sodio, cloro y agua del hueso, algo del líquido extracelular del conectivo denso, probablemente gran parte del agua y electrolitos extracelulares del cartílago y casi todo el espacio transcelular, a la fase intracelular. (Gotch, Nadell y Edelman, 1957; Edelman y Leibman, 1959).

En la actualidad se mantiene el concepto de una fase intracelular simple por razones utilitarias (Leaf, 1970) aunque, probablemente, con la progresión de los métodos analíticos se demostrarán subdivisiones del agua y electrolitos intracelulares, basadas o en diferencias en la composición de los componentes celulares, o de las células de diferentes órganos y tejidos. (Passmore y Drapen, 1964; Baron y ahmed, 1969)

Sin embargo la fase extracelular, desde el estudio de Edelman y Leibman (1959) se ha subdividido para interpretar adecuadamente los datos derivados de los estudios de dilución, balances metabólicos y análisis de tejidos. (Walsen, 1967)

La heterogeneidad de la fase extracelular hace improbable el que cualquier método de dilución sea adecuado para dar una delimitación adecuada de la totalidad del agua y de los electrolitos no intercelulares. (Barrat y Walsen, 1969). Ciertamente, las estimaciones dispares obtenidas por el volumen de dilución de distintos trazadores llevaron a la conclusión de que "no solo son poco fiables las estimaciones de su tamaño, sin que incluso la naturaleza de la fase extracelular es oscura" (Manery, 1954).

Edelman y Leibman (1959) propusieron que el agua y los electrolitos podrían ser descritos con precisión razonable como distribuidos en cuatro subdivisiones principales:

- 1.- Plasma
- 2.- Linfático e Intersticial
- 3.- Conectivo Denso, Cártílago y Hueso
- 4.- Transcelular; división que persiste en la actualidad.

Antes de pasar a efectuar una breve descripción de estos espacios, conviene hacer unas consideraciones importantes. En primer lugar debemos resaltar que aunque fisiológicamente existe una relación estrecha entre el agua corporal y los electrolitos en ella disueltos, (Gamble, 1951) puesto son ellos los que determinan el contenido de agua en cualquiera de las fases, excedería las posibilidades de la presente revisión al estudiar detalladamente la distribución del agua y de los electrolitos, debiendo limitarnos a la primera únicamente.

En segundo lugar, diremos que las subdivisiones de la fase extracelular están basadas principalmente en la diferente estructura electrolítica observada en cada una de ellas, siendo secundario su contenido en agua (Edelman y Leibman, 1959; Bland, 1963; Passmore y Drapen, 1964)

Los conceptos actuales sobre el metabolismo y la distribución del agua corporal siguen siendo los formulados por Elkinton (1950) de que el organismo de un mamífero constituye una fase acuosa continua; el agua difunde ligeramente a través de los tejidos corporales, estando limitada esta difusión únicamente por el potencial químico del agua misma (Bland, 1963). Aunque las tasas de intercambio molecular de agua entre la sangre, el fluido intersticial y el agua celular varían ampliamente de tejido a tejido, no se conoce ningún espacio de agua

2.1. Volumen Plasmático

Los límites del volumen plasmático están constituidos por los elementos celulares de la sangre, y el corazón y los grandes vasos. Estas barreras anatómicas no son demasiado restrictivas puesto que tanto las proteínas plasmáticas como los elementos celulares pasan dentro y fuera de la circulación en el hígado, bazo, médula ósea; sin embargo la significación funcional y anatómica del volumen plasmático ha sido clara y extremadamente justificada en varias revi_

siones (Gregersen, y Fawson, 1959; Dagher y cols. 1965)

Los métodos para estimar el volumen plasmático ha sido revisados por Lawson (1962) y Dagher y cols, (1965) y caen principalmente dentro de dos categorías:

1.- Albumina o Globulina marcada por un colorante (Azul de Evans T-1824 u otras), radioisótopos (I^{131} , Cr^{51} , S^{35}) o antígenos.

2.- Marcaje de los glóbulos rojos con Fe^{59} , P^{32} , Cr^{51} o Torio B.

Los volúmenes plasmáticos estimados a partir del marcaje de proteínas son en promedio un 10 o 15 por ciento más altos que las estimaciones basadas en la dilución de células rojas, y valor hematocrito venoso, diferencia que ha sido analizada en términos de pérdida de proteína marcada durante la fase de mezcla y errores en la determinación del hematocrito (Berson, 1954) pero esta pérdida de proteína es mínima por lo que las estimaciones del volumen plasmático por estos métodos pueden ser aceptadas como razonablemente exactas. (Dagher y cols, 1965)

Sjostrand (1962 en su revisión sobre el volumen plasmático, da como valores medios 58 ml / kg peso corporal, y 34ml / Kg peso corporal para el hombre y la mujer normales, aumentando con el tamaño y la superficie corporal y variando

con la edad solo en relación a las variaciones de peso.

2.2. Volumen de Líquido Intersticial y Linfático.-

Este compartimento está en una estrecha relación funcional y estructural con el plasmático (Pappenheimer, 1953) habiendo sido revisadas sus similitudes y diferencias en composición química por Manery (1954). El volumen de agua de este espacio no ha sido medido aún con exactitud porque no se ha encontrado una sustancia que quedando excluida de las células, se distribuya rápidamente por el líquido intersticial-linfático. (Moore y cols, 1963).

El tejido conectivo denso difiere de los tejidos de equilibración rápida en que un 75% de su fase extracelular aparentemente se equilibra con lentitud con los sacaridos (Nichols y cols., 1953; Walser, 1967; Crone, 1970)

Excluyendo el 75% de dichos tejidos, el manitol o la inulina pueden dar estimaciones razonables de este volumen intersticial linfático. (Edelman y Leibman, 1959)

Después de efectuar una corrección por el volumen plasmático, el volumen intersticial-linfático de equilibrio rápido puede estimarse como 120 ml/kg peso corporal o 20% del agua corporal total en varones adultos normales. Esta

cantidad incluye el 25% de equilibrio rápido de la fase extracelular (Nichols y cols., 1953).

2.3. Agua del Tejido Conectivo Denso. Cartílago y Hueso.-

El hueso, el cartílago y el resto de los tejidos conectivos densos tienen una estructura química peculiar; además, las diferencias en su estructura anatómica unidas a su escasez de vascularización hacen que estos tejidos presenten una equilibración más lenta de los trazadores que el resto de los tejidos (Nichols y cols., 1953; Cotlove, 1954; Walser, 1967)

La fase sólida del hueso tiene una estructura microcristalina que actúa como una superficie de intercambio iónico, ligando sodio en cantidades muy superiores a su concentración en el líquido intersticial (Bergstrom and Wallace, 1954; Edelman y cols., 1954; Agna y cols., 1958); por esta razón estos tejidos fueron descritos como una subdivisión diferenciada del agua corporal.

No se ha hecho aún una estimación directa del contenido total de agua en estos tejidos; (Chinard y cols, 1966) sin embargo, (Edelman y Leibman, 1959) derivaron una estimación de los datos aportados por Lightfoot y Coolidge (1948) sobre la distribución del colágeno. Basándose en la asunción de que el 70% del tendón y del cartílago es agua, estos autores estimaron que el agua del tejido conectivo total exceptuando al hueso es de unos 4,2 litros para un adulto normal

TABLA 5

VOLUMEN DE DISTRIBUCION DE LOS SACARIDOS EN EL HOMBRE

SEX	SACCHARIDE	EQUILIBRATION TIME (HR.)	ML./KG. OF BODY WEIGHT	
			Mean	Range
M (n = 7)	Mannitol	6	159	141-187
M (n = 7)	Inulin	6	157	136-175
M (n = 11)	Sucrose	5	175	140-197

n = number of subjects.
Edelman et al.²²

TABLA 6

CONTENIDO DE AGUA DEL HUESO; CARTILAGO, TENDON Y PIEL EN EL HOMBRE Y ANIMALES

TISSUE	ML./KG. OF TISSUE	% OF BODY WATER	REMARKS
Bone.....	340 (n = 37)
Bone.....	284 (n = 2)	8.5	Total skeleton, including marrow, taken shortly after death.
Bone.....	318 (n = 16)	Tissue aliquots excluding marrow taken shortly after death
Cartilage.....	705	Tissue aliquots taken post mortem
Cartilage (dog).....	750 (n = 13)	Tissue aliquots taken from normal animals
Tendon (rabbit).....	618 (n = 14)	Tissue aliquots taken from normal animals
Tendon (dog).....	667 (n = 8)	Tissue aliquots taken from normal animals
Skin.....	623 (n = 25)	Tissue aliquots taken post mortem

n = number of subjects.
Edelman et al.²²

de 70 Kg. Alrededor de 25% de este volumen se equilibra rápidamente con los sacáridos y se clasifica como líquido intersticial, así pues permanecen 3,2 litros como agua extracelular del tejido conectivo denso (incluyendo el cartílago pero no el hueso) es decir un 7,5% del agua corporal total.

El carácter relativamente acelular de estos tejidos conectivos densos y hueso, confirmado histológicamente y por el hallazgo de que la concentración de cloro por Kg. del agua de los tejidos es similar a la concentración del plasma (Overman, 1951; Nichols y cols, 1954), hace que el agua de los tejidos conectivos densos y el hueso pueda ser considerada casi por entero como extracelular (Chinard y cols, 1966).

Una estimación aproximada del agua total esquelética es de 3,4 l. para un hombre normal de 70 Kg. de peso, basada en el hueso siendo un 16 % del peso corporal (Edelman y cols., 1954; Forbes y Lewis, 1956; Agna y cols., 1958). Es improbable que mas de un 10% de esta cantidad sea accesible a la penetración de los trazadores sacáridos como la insulina, ya que la mayor parte del agua del hueso es agua ligada aunque sea intercambiable (Edelman y cols, 1954; Neuman y Neuman, 1957). El agua extracelular ósea inaccesible sería pues unos 45 ml./Kg. peso corporal o un 7,5% del agua corporal total.

2.4. Líquidos Transcelulares.-

El término "líquido transcelular" fué introducido para designar una variedad de líquidos extracelulares que no son simples trasudados y que tienen en común la propiedad de estar formados por la actividad de transporte de las células (Edelman y cols., 1952).

Estos líquidos se encuentran en las glándulas salivares, el pancreas, el hígado y el árbol biliar, el tórax, las gónadas, la piel, las membranas mucosas de los tractos respiratorio y gastrointestinal y los riñones, en adición a los líquidos cavitarios en el ojo, el líquido cefalorraquídeo y el líquido intraluminal del tracto gastrointestinal.

La composición electroforética de estos fluidos difiere de la de un simple ultrafiltrado del plasma, y los sacáridos igual que otros trazadores para el agua extracelular no aparecen en la bilis, secreciones gastrointestinales o líquido cefalorraquídeo (Laviates y cols., 1936; Kruhffer, 1946; Kleeman y cols., 1955).

Edelman y Leibman (1959) dan estimaciones de estos líquidos como sigue:

Gastrointestinal Intraluminal: 7.4 ml. / Kg. de peso corporal equivalente a 1,4% del agua corporal total. (Esta cifra

obtenida por examen postmortem solo debe considerarse como tentativa puesto que pueden existir desplazamientos del agua y / o los electrolitos en la agonia, o postmortem, que conduzcan a errores de estimación. (Gizek, 1954; Gotch, Nadell y Edelman, 1957)

Arbol Biliar: 2,1 ml. / Kg. peso corporal, calculados a partir del volumen medio de la vesícula biliar (50 ml.) y un 5% del agua total del hígado.

Líquido Cefalorraquídeo: 2.8 ml. / Kg. peso corporal (Lup y Haam, 1954; Schain, 1964; Bradbury y cols., 1963).

El cálculo del remanente (3 ml. / Kg. peso corporal) basado en pesos normales estimados de riñones, tiroides, pancreas, gónadas, glándulas salivares y contribuciones de mucosas y glándulas secretorias de los tractos respiratorio y gastrointestinal, puede ser erróneo por un factor de 2 ó 3, pero en términos absolutos es razonable asumir que estos componentes del líquido transcelular no suman menos de 100 ml. o más de 600 ml. en el adulto medio. Por lo tanto el líquido transcelular total se estima como unos 15,3 ml. / Kg. peso corporal equivalentes a un 2.5% del agua corporal total.

Como resumen presentamos el esquema simplificado de Edelman y Leibman (1959) de distribución del agua corporal en el hombre adulto normal que aún sigue considerandose vigente.

TABLA 7

VOLUMEN DE AGUA TRANSCELULAR

SOURCE	ML./KG. OF BODY WEIGHT	% OF BODY WATER	REMARKS
Intraluminal gastrointestinal.....	7.4	1.4	Obtained at postmortem examination
Intraluminal gastrointestinal (dog).....	19.0	3.0	Normal dogs sacrificed after 24-hour fast
Cerebrospinal fluid.....	2.8
Biliary tree.....	2.1	Calculated from the average gallbladder volume (50 ml.) and 5 per cent of total liver water
Remainder.....	3.0	Calculated as 15 per cent of organ weights, including the mucosal layer of the gastrointestinal tract plus aque- ous and vitreous humor.

Edelman et al.²²

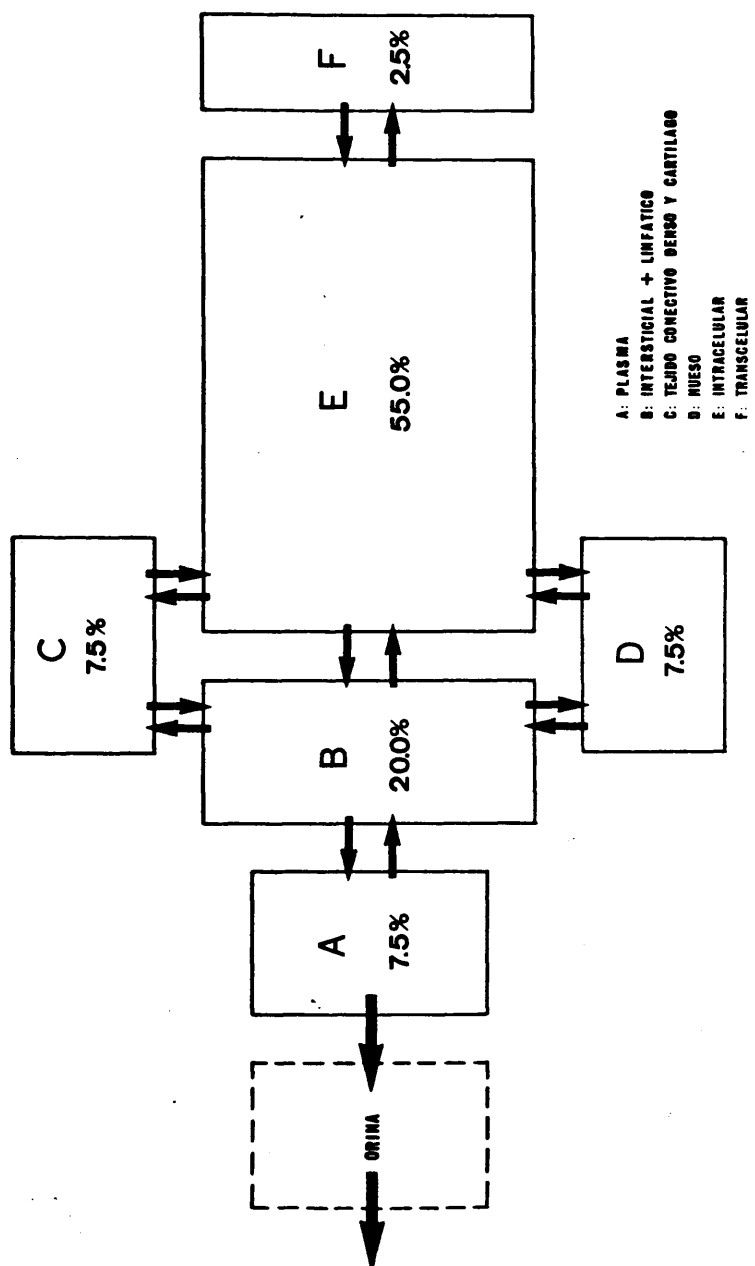
Este esquema enfatiza tanto la heterogeneidad de los líquidos extracelulares como la considerable magnitud de los líquidos extracelulares que no son una parte directa del "pool" plasma-líquido intersticial.

3. UTILIZACION DEL AGUA TRITIADA COMO TRAZADOR PARA EL AGUA CORPORAL : CINETICA DE DISTRIBUCION DEL AGUA TRITIADA EN EL ORGANISMO.

Los estudios sobre Composición Corporal y dentro de ellos, sobre el Contenido Total de Agua en el organismo, tuvieron un considerable desarrollo durante las dos décadas comprendidas entre 1940 y 1960, en las que se sucedieron los trabajos publicados por una serie de equipos (Edelman, Leibman y sus colaboradores; Schloerb y colaboradores; Moore y colaboradores; Soberman y colaboradores, etc.) que constituyen las tres cuartas partes de las referencias bibliográficas de cualquier trabajo publicado actualmente sobre dicho tema.

El trazador que se utilizó más ampliamente en estas estimaciones del Volumen Agua Corporal fué el Oxido de Deuterio, introducido por Hevesy y Hofer (1934) y utilizado por primera vez en Norteamérica por Moore (1946) con el que se estudió no solo el parámetro estático de su volumen de distribución, sino también las características dinámicas de su distribución corporal (Schloerb y cols., 1950; Edelman, 1952). Aunque el Agua Tritiada había sido introducida pa-

FIGURA 1



DISTRIBUCION DEL AGUA CORPORAL EN EL HOMBRE

[TOMADO DE: EDELMAN I.S. & LEIBMAN J.: AMER. J. MEDICINE, 27: 256, 1959]

ra estos estudios por Pace y cols. en 1947, las dificultades inherentes a su determinación con la cámara de ionización o el contador Geiger-Müller, impidieron que se extendiera su uso como trazador, hasta que Langhan y colaboradores (1956) describieron un método de determinación de tritio en fluidos biológicos utilizando un Contador de Centelleo Líquido que podía competir con éxito en cuanto a simplicidad con los métodos de determinación del Óxido de Deuterio en muestras biológicas, como fue demostrado en un estudio comparativo del Agua Tritiada y el Oxido de Deuterio como trazadores para el Agua Corporal por Leibman y colaboradores (1960).

Hasta entonces, los trabajos publicados sobre el volumen de Agua Corporal Total utilizando Agua Tritiada constituían sólo una pequeña proporción del total de estos estudios: Altman y Dittner en el "Handbook of Blood and other Biological Fluids" (1961) recogen solo 3 referencias bibliográficas de estudios realizados con Agua Tritiada frente a 20 con Oxido de Deuterio. Sin embargo, desde el trabajo de Leibman y cols. (1960) esta situación se invirtió y el Agua Tritiada desplazó casi por completo al resto de los trazadores (Moore y cols., 1963).

A partir de 1960 los estudios sobre Composición Corporal se han hecho menos frecuentes, apareciendo las estimaciones del Volumen de Agua Corporal Total solo como partes de estudios más amplios sobre otros temas, generalmente estudios

clínicos como en Surveyor (1969) ó Cook y cols. (1969) por ejemplo.

En este tipo de estudios, sus autores utilizan la dilución de Agua Tritiada para la determinación del Volumen de Agua Corporal según métodos descritos previamente, generalmente los de Langham y cols. (1956) y Leibman y cols. (1960) o modificaciones de ellos, básicamente en cuanto a la metodología de determinación del Tritio en el Contador de Centelleo Líquido. Generalmente, no se ha realizado un estudio crítico de las bases conceptuales en que se apoyó el desarrollo de estos métodos, sino que se han aplicado asumiendo que proporcionan una estimación razonablemente exacta del Volumen de Agua Corporal.

Estas consideraciones pueden ayudar a comprender por qué algunas de las preguntas que planteaba Pinson (1952) en su estudio sobre los isótopos del hidrógeno como trazadores del Agua Corporal, acerca del comportamiento del Tritio en el organismo, permanecen aún hoy sin respuesta, como veremos en una corta revisión de los datos publicados sobre la Cinética de distribución del Tritio en el organismo.

3.1. Absorción del Agua Tritiada por el organismo

3.1.1. Absorción por vía Gastrointestinal

Pinson y Langham (1957) en un excelente, y prácticamente único, estudio sobre la fisiología y toxicología del tritio,

estudiaron su absorción a través de distintas vías, por el organismo humano.

Tras la ingestión de una dosis de HTO en un volumen de variable de agua, en tres sujetos la actividad de tritio en sangre venosa comenzó a aumentar dos a nueve minutos después y subió rápidamente durante 30-40 minutos. La actividad en sangre alcanzó su máximo en unos 40-45 minutos y decreció después lentamente hasta que, según Pinson y Langham, se alcanzó el equilibrio con todos los líquidos corporales a las 2 - 2,5 horas.

El incremento de actividad en sangre fue lineal con respecto al tiempo. La actividad del Tritio en la Orina siguió estrechamente a la actividad en sangre durante la última parte del experimento. Entre los 30 y 60 minutos la actividad media en orina fue entre 3 y 5% más alta que en la sangre venosa en todos los experimentos.

Langham y cols. (1956) estudiando un varón joven encontraron los máximos de actividad en plasma y orina a los 20 minutos y el equilibrio a los 90 minutos de la ingestión.

Estos datos son muy similares a los obtenidos para el Oxido de Deuterio. Hevesy y Hofer (1934) observaron que el equilibrio del HDO ingerida con los fluidos corporales parecía tener lugar a las 2,5 horas de la ingestión de 2 litros de líquido.

Con volúmenes menores, London y Ritemberg (1950) encontraron que el Deuterio comenzaba a aparecer en sangre venosa 7 minutos después de la ingestión de 45 ml. de D_2O en 450 ml. de Agua y que la absorción, o el equilibrio del Deuterio en la sangre era completa a los 40 minutos. Tiempos similares fueron reportados por Pinson y Anderson (1951) y Schlcerb y cols., (1951). Pinson (1952) daba cuenta de que hasta entonces no se había determinado si las tasas de absorción diferían para H_2O , HDO o HTO ; hasta donde llega nuestro conocimiento, tal estudio sigue sin realizarse.

3.1.2. Absorción por los Pulmones

Pinson y Langham (1957), en cinco experimentos de inhalación de vapor de HTO durante periodos de 4-5 minutos por tres varones sanos, indican que un 98-99% del HTO inspirada se intercambió en el tracto respiratorio y se retuvo en el organismo. Estas cifras concuerdan sustancialmente con un estudio mas reciente de Osborne (1966) sobre la protección frente a la inhalación de HTO en la industria.

Durante la inhalación, la actividad de Tritio en sangre subió rápidamente y después decayó exponencialmente con una vida media de unos 12 minutos, estableciendose un equilibrio a las 1,5 horas aproximadamente tras la exposición.

Al suspender la inhalación, la actividad de Tritio en el vapor de agua expirado disminuyó rápidamente acercándose a la de la sangre en unos 30 minutos. La actividad en

muestras de orina, recogidas a una tasa de secreción de orina de 1 ml./ min., subió mas lentamente que la de sangre venosa, alcanzando un máximo a los 25-40 minutos de la exposición. Durante los primeros 25 minutos la actividad en orina fue más baja que en sangre venosa. Desde los 25 minutos a las 2 horas aproximadamente, la actividad en orina fué un pequeño porcentaje mas alta que en la sangre, y, a partir de entonces, las dos actividades fueron iguales dentro de los límites del método analítico. La orina fué recogida en intervalos de 15 ó 20 minutos.

Cuando la tasa de secreción de orina fué mas alta, se hizo más rápido el aumento de la actividad de tritio en orina con la inhalación; casi igual al de sangre venosa. En este caso, además, pudieron describirse dos componentes exponenciales en el decremento de actividad, con vidas medias de 5 y 20 minutos.

Pinson y Anderson (1950, 1951) encontraron que si los líquidos corporales contienen previamente HTO , la concentración de tritio en los líquidos corporales. Si existe una diferencia en las tasas de transferencia del HTO y el H_2O a través de las membranas alveolares y su difusión en el aire alveolar, es pequeña comparada con los tiempos envueltos en estas transferencias y, por lo tanto, se obtiene el equilibrio isotópico durante el periodo en que el aire ins_

pirado permanece en el alveolo (Campbell y col., 1951; Pinson y Anderson, 1951).

3.1.3. Absorción a través de la Piel

Cuando se expuso la piel del antebrazo de un hombre a una atmosfera saturada de HTO durante 15 minutos a 1 hora a temperatura ambiente, se absorbió un promedio de 0,018 mg./cm²/min. de agua al interior del cuerpo (Pinson y Langham, 1957). La tasa de absorción fué comparable a la de perspiración insensible lo que sugiere un intercambio de agua a través de la piel por difusión en ambas direcciones. La cantidad de HTO absorbida fué proporcional a su concentración en la atmósfera saturada, el área de piel expuesta y el tiempo de exposición. La disminución en la actividad de tritio en la perspiración insensible recogida del área expuesta fué exponencial con el tiempo siguiendo a la exposición; aparentemente con dos términos exponenciales, el más lento de los cuales presentaba una vida media de unos 20 minutos cuando el sujeto estaba a una temperatura confortable y 55 cuando se disminuía la temperatura. Estos periodos probablemente representan la vida media de la "capturación" de HTO en el área superficial extravascular, justo por debajo de la superficie cutánea, por los líquidos circulantes; por ello su duración aumentaba al disminuir el aflujo sanguíneo a la piel por la acción del frio.

Asimismo, el incremento de la actividad de tritio en orina

fué más o menos rápido dependiendo de la temperatura: cuando el sujeto estaba vestido y a temperatura normal la actividad en orina aumentó con el tiempo durante unas 2 horas alcanzando el equilibrio a ese tiempo. La tasa de aparición de tritio en orina disminuyó apreciablemente al mantener al sujeto a una temperatura ambiente de 15° durante 4 horas. Solo un 70% del HTO absorbida por la piel se distribuyó por los líquidos corporales durante ese tiempo. Al colocar al sujeto en un baño caliente la actividad de Tritio en orina alcanzó un máximo en unos 20 minutos y decayó a un valor final de equilibrio en unas 2 horas.

Cuando la piel se expuso a HTO líquida, la tasa de transferencia de agua a través de la piel osciló entre 0,040 y 0,065 mg./cm²/min. Por lo demás, los resultados fueron similares a los descritos. De Long y col. (1951) reportaron datos similares sobre la absorción de HTO a través de la piel.

3.1.4. Inyección en el Sistema Circulatorio

Leibman y cols. inyectaron el HTO en la vena cubital y recogieron las muestras de sangre a través de una cánula emplazada en la arteria femoral empezando un minuto tras la inyección. Prentice y colaboradores inyectaron el HTO y recogieron las muestras en la vena antecubital, procedimiento que es el que se sigue usualmente (De Grossi, 1965;

Gundersen y Shen, 1966; Moore, 1968; Cardús y cols., 1969; Owen y cols., 1969; etc.). La actividad de tritio en sangre venosa aumenta rapidamente aunque no se han dado datos sobre el tiempo que tarda en llegar a un máximo, y decae exponencialmente a continuación llegando a un equilibrio en unas 2 horas (Prentice y cols., 1952; Leibman y cols., 1960).

Schloerb y cols. (1950) reportaron que tras la inyección de D_2O en la vena anticubital, la concentración de óxido de Deuterio en sangre arterial era mucho más alta que en sangre venosa durante 1 hora o más después de la inyección.

3.2. Distribución del Agua Tritiada en el organismo e incorporación del Tritio a los constituyentes orgánicos.

Cuando el Oxido de Deuterio o el Agua tritiada son introducidos en el organismo por ingestión, inyección, inhalación o en cualquier otra forma, el deuterio y el tritio son diluidos por intercambio con los átomos de hidrógeno del agua o los átomos de hidrógeno intercambiables en las moléculas orgánicas. Estos últimos incluyen los átomos de hidrógeno en los grupos aminos, carboxidos, hidróxilos, y iminos, sulfhidrilos, y en otras posiciones, generalmente cuando el átomo de hidrógeno no está ligado directamente a un átomo de carbono (Schloerb y cols., 1950; Prentice y cols., 1952; Hevesy y Jacobson, 1940).

Se ha estimado que los átomos de hidrogeno de intercambio rápido producirían un efecto de dilución para el HTO (o el HDO) equivalente a un volumen de agua de 0,5-2% del peso corporal (Schloerb y cols., 1950; Prentice y cols., 1952; Edelman, 1952; Pinson y Langham, 1957).

Prentice y cols, (1952) encontraron una diferencia en el "volumen" de átomos de hidrógeno lábiles entre los diversos tejidos, en el conejo. En la grasa no pudieron detectar intercambio alguno; en el hígado, riñón y sólidos del plasma encontraron un porcentaje de intercambio consistentemente más alto que en el músculo y tracto gastrointestinal, división que correspondería aproximadamente con la de vísceras y carcasa.

El Tritio entra también en posiciones de hidrógeno menos lábiles, cuando los átomos de hidrógeno están unidos directamente a los átomos de carbono, a través de procesos más lentos envoviendo reacciones químicas en el metabolismo corporal. Tales intercambios son de gran importancia en el estudio del metabolismo intermediario del organismo (Schloenheimer, 1942) pero son demasiado lentos para tener alguna consecuencia en las determinaciones del Volumen de Agua Corporal en que la duración del experimento es bastante breve.

Thompson (1952, 1953) estudió la evolución de la actividad de tritio, en los líquidos corporales y los tejidos, en roedores, tras la administración crónica de HTO y encontró

que la actividad en el agua extraída de los tejidos decaía con una vida media de unos 12 días mientras que la actividad de tritio en los tejidos mostraba dos componentes, uno con vida media de 9 días y otro con vida media de 90 días. Pinson y Langham (1957) siguieron la actividad de tritio en orina, tras administración crónica de HTO a ratas, encontrando dos componentes con vidas medias de 1,9 y 12 días.

Más recientemente, Snyder y cols. (1968) y Lambert y cols. (1971) estudiando dos casos de entrada accidental de HTO en el organismo humano (por piel y pulmones) describen dos componentes en la disminución exponencial de la actividad de tritio en la orina con vidas medias de aproximadamente 9 y 36 días.

3.2.1. Intercambio entre los Líquidos Vasculares y Extravasculares.-

La suma total del intercambio de agua entre la sangre y todo el agua extravascular ha sido determinada por dilución de D_2O en la sangre tras inyección intravenosa. La desaparición del Oxido de Deuterio de la sangre venosa fué descrita por Schloerb y cols. (1950) como consistente de dos términos exponenciales:

$$C(t) = A \cdot e^{-r_1 t} + B \cdot e^{-r_2 t} - C_E$$

donde $C(t)$ es la concentración en volúmenes por ciento de

oxido de Deuterio en sangre venosa al tiempo t . A es la ordenada en el origen del componente rápido inicial y r_1 su constante exponencial, B y r_2 los términos equivalentes para el componente lento, y C_E la Concentración de D_2O al equilibrio.

El mismo resultado fué publicado por Leibman y cols. (1960) para el Agua Tritiada en un experimento de una hora de duración. Las vidas medias de estos componentes serian de unos 75 segundos y 9,5 minutos respectivamente. Tomando el tiempo de vida media más largo podría calcularse que un 99% del equilibrio entre los líquidos vasculares y extravasculares se establecerian en 1 hora aproximadamente.

Pinson (1952) considera que estas dos tasas de disminución exponencial representarían dos áreas generales extravasculares orgánicas, cada una de las cuales tendría una tasa de intercambio característica con el líquido vascular.

Si tenemos en cuenta lo que decimos en el Capitulo Segundo sobre ajuste de curvas exponenciales a datos experimentales podremos evaluar mejor estos resultados, teniendo en cuenta además que Leibman y cols. (1960) siguieron la desaparición de D_2O y HTO de la sangre arterial durante solo una hora con un total de 10 observaciones.

Una de las asunciones básicas en teoria de trazadores (ver

Capítulo Segundo) es la de que el trazador se comporta de la misma forma, en intercambios o reacciones químicas, que la sustancia trazada.

La certeza de tal asunción para el caso de los isótopos pesados del hidrógeno usados como trazadores de este, no ha sido demostrada concluyentemente aún.

Considerando la gran diferencia de masas entre el hidrógeno y el deuterio o el tritio, habría razones para considerar con escepticismo el grado en que el comportamiento de cualquiera de estos isótopos es paralelo al de los otros. Pinson (1952) recogió una serie de datos publicados previamente presentando evidencias de que la tasa de difusión a través de las membranas no es la misma para el H_2O , D_2O y el HDO , de que no entran en las reacciones químicas en la misma forma exactamente y desde algunos procesos metabólicos en los seres vivos pueden ser alterados por concentraciones apreciables de D_2O . Estas diferencias podrían ser debidas a diferencias en propiedades físicas tales como viscosidad, densidad, coeficiente de difusión etc.

Glasflock y Dunscombe (1954) han descrito un fraccionamiento diferencial de los isótopos pesados del hidrógeno en la glándula mamaria y el hígado debido a una tasa de difusión a través de las membranas diferente, y resultados similares han sido publicados por Bowen (1960). Elford (1970) también ha encontrado diferencia en la permeación del mus_

culo estriada y lizo por el agua deuterada y el agua tritida.

Por otra parte, Anbar, y Lewitus (1958) estudiaron la distribución de agua marcada con Tritio, Deuterio y Oxígeno-18 sin encontrar diferencias apreciables entre las tasas de distribución de las tres aguas, aunque su diseño experimental deja algo que desear.

3.3. Excreción del Tritio del organismo.-

Pinson y Anderson (1950, 1951) reportaron que la concentración del HTO en el agua de la orina, esputos, sudor, heces y perspiración insensible es la misma dentro de la sensibilidad de la medición, que la existente en el agua de la sangre en el momento de recoger estas excretas. Schloerb y cols. (1950) hallaron los mismos resultados para el D_2O en orina y jugo gástrico en el hombre.

La eliminación del Tritio (o del Deuterio) a partir de los líquidos corporales sería exponencial con respecto a la entrada o la salida de agua en el organismo (Pinson y Anderson 1950) y exponencial con respecto al tiempo si la tasa de ingesta de agua es mas o menos constante.

Pinson y Anderson (1950) han publicado valores para el Tiempo de Vida Media Biológica del Tritio en el organismo (es decir el tiempo en que la concentración de tritio en

cualquier líquido corporal se reduce a la mitad de la inicial) oscilando entre 9 y 14 días para 9 varones sanos con ingestión de agua "ad libitum" (2,7 l./día aprox.), reduciéndose a 2,5 días en un sujeto con una ingestión de 12,8 l / día. Langham y cols. (1956) dan una cifra de 11 días para un sujeto varón, Pinson y Langham (1957) de 13,9 días en 3 varones adultos, Foy y Schnieden (1960) de 7,5 días (variando entre 5 y 11 días para los 10 individuos estudiados), Butler (1964) de 9,5 días (oscilando entre 4 y 18) para 310 sujetos, y Moore y cols (1968) de 13 días para un solo sujeto.

3.4. Estimación del Volumen de Distribución de Agua Tritiada.

Asumiendo que la actividad de tritio en los líquidos corporales alcanza un equilibrio de distribución en unas 2 horas, (Pinson y Anderson, 1951; Edelman y cols., 1952; Prentice y cols., 1952; Langham y cols., 1956; Pinson y Langham, 1957; Leibman y cols., 1960), para el cálculo del volumen de distribución del agua tritiada, equivalente al volumen de Agua Corporal Total, simplemente se toma la concentración (o actividad específica del trazador en equilibrio y se utiliza la fórmula:

$$C_E = R_0 / V_{DIC}$$

Siendo C_E la concentración (o actividad específica del tra

zador) en el Equilibrio; R_0 la dosis total administrada del trazador y V_{DIC} el volumen en que se ha distribuido dicha dosis.

La determinación de la actividad específica del trazador en el equilibrio puede hacerse indistintamente en cualquier líquido corporal puesto que será la misma en todos. Generalmente se ha usado la orina por producir menores molestias al paciente que las tomas de sangre.

Así, la metodología experimental de las determinaciones generalmente consiste en hacer ingerir o inyectar intravenosamente al sujeto un volumen de HTO cuya actividad absoluta conocemos a continuación se toma una o varias muestras en plasma y en orina a partir del momento teórico del equilibrio, y de la actividad específica del Tritio en ellas se determina el volumen de distribución del Agua Tritiada.

Prentice y cols.(1952) tomaron muestras de sangre a los 2,4 y 6 horas tras la inyección y utilizaron la media de las tres actividades de Tritio en ellas para calcular el volumen de dilución del HTO. Debido a la larga Vida Media Biológica del HTO en el organismo, consideraron, que el promedio de las actividades a las 2,4y 6 horas era más de fiar que la extrapolación al tiempo 0 de la recta de regresión obtenida con las actividades a las 3, 6 y 24 horas.

Pinson y Anderson (1951), Edelman(1952), Pinson y Langham

(1957) utilizaron la Actividad de Tritio en plasma a las 25 horas, Langham y cols. (1956) a los 90 minutos, Leibman y cols. (1960) a las 6 horas.

Generalmente la metódica que se ha seguido ha sido de recoger muestras de plasma u orina durante unas 5 horas tras la inyección y utilizar como Actividad Específica del Tritio para determinar el volumen de dilución la actividad de una de ellos o de un promedio de varias: Foy y Schnieden (1960), Richmod y cols. (1962), Foy (1964), De Grossi (1965), Gundersen y Shen (1966), Moore (1968), Cardús y cols. (1969) Cook y cols (1969), Surveyor (1969), Owens y cols. (1969).

En pocos casos se han realizado determinaciones simultáneas en plasma y en orina por considerarlas inútiles; cuando se ha hecho así, se han descrito diferencias entre las actividades de tritio en plasma y orina (Gundersen y Shen, 1966; Cardús y cols; 1969) aunque no se les ha concedido ninguna significación.

McTaggart y Cardús (1968), desarrollaron formulas para calcular el Volumen de Dilución del Agua Tritiada a partir de actividad en el plasma a distintas horas tras la inyección, teniendo en cuenta la fracción de la dosis administrada de HTO que se va perdiendo por la orina. Pero al no tomar en cuenta ninguna otra vía de excreción, los Volúmenes de Dilución del Agua Tritiada calculados por sus formulas van

haciéndose cada vez mayores con el paso del tiempo.

3.5. Resumen de la Cinética de Distribución del Agua Tritiada en el organismo

Como resumen de lo que llevamos dicho, vamos a delinear brevemente un modelo cinético para el agua tritiada en el organismo, sirviendonos basicamente del modelo publicado por Moore y cols. (1968) y dejando para más adelante la discusión de algunas de sus características.

Los eventos que siguen a la inyección o ingestión de una dosis única de HTO en el sistema venoso son principalmente:

1. Una primera fase de Circulación y Permeabilidad:

La curva de aparición de una dosis única de agua tritiada en la aorta después de su inyección en el sistema venoso tiene la configuración de la curva de Stewart-Hamilton para la dilución de un colorante. El volumen en que el HTO se ha diluido puede calcularse de esta curva y también puede medirse el tiempo medio de tránsito.

El tiempo y la manera de aparición indican el gasto cardíaco modificado por la dilución del trazador en el agua pulmonar durante su primer tránsito a través de la microcirculación pulmonar; por tanto, la curva puede usarse para

medir el volumen de agua pulmonar (Chinard y cols., 1967). Durante esta primera fase de mezcla en la inculación y permeación, la curva está definida por dos componentes exponenciales (Edelman, 1952) que como dijimos pueden representar la permeación a dos áreas generales extracelulares (Pinson, 1952).

2. Una fase principal de Dilución:

Durante la cual la actividad de tritio en sangre se reduce a un volumen de dilución que indica el hidrógeno total intercambiable. Este hidrógeno está localizado mayormente en las moléculas de agua y por lo tanto esta fase de dilución inicial (30-120 minutos) medirá el volumen de agua corporal total (o el volumen de hidrógeno intercambiable total si la concentración del trazador se expresa como actividad / por unidad de peso de hidrogeno, generalmente equivale a 4.300 g.).

3. Fase de penetración más lenta en otras áreas permeables al trazador:

Hay probablemente zonas de permeación lenta del agua corporal con los que el HTO se equilibra después de las primeras horas. Podrían suponerse localizados en la capa más profunda de hidratación de la estructura cristalina de huesos y dientes, y probablemente en el contenido del agua de la capa epidérmica superficial y el pelo. Estas áreas no han sido demostradas y seguramente son de muy pequeña

magnitud (1 - 1,5% del hidrogeno intercambiable total según Moore y cols; 1968).

4. Perdidas por Incorporación o síntesis; El "Sumidero" metabólico:

Supondría la incorporación del tritio a constituyentes orgánicos intercambiándose con átomos de hidrógeno, como hemos visto anteriormente.

5. Una Tasa de excreción dependiente de la ingesta de agua:

Una ingesta de agua alta acelerará la excreción de agua marcada y no marcada. Esto aumenta la inclinación de la pendiente del "decay" biológico al aumentar la excreción del tritio y su dilución con el hidrógeno ingerido. Si se suprime la ingestión de agua, la excreción de tritio por la orina se mantiene durante un tiempo a la misma actividad específica que la del Plasma. Esta excreción continuada en una ingesta carente de agua no disminuiría por si misma, la concentración del trazador en los líquidos corporales.

6. Ganancia de la Sustancia Trazada por formación dentro del cuerpo; La "Fuente" Metabólica:

La producción de nuevas moléculas de agua dentro del organismo ocurre a partir del agua de oxidación de los alimentos ingeridos y el agua de oxidación del protoplasma corporeo.

ral (principalmente la grasa). La oxidación de la grasa contribuye con un ml. de agua por cada gramo de grasa oxidada totalizando unos 175 ml. por día. Debido a que la oxidación de la grasa está en función de la demanda calórica total del individuo, la curva de dilución de HTO suprimiendo la ingestión de agua constituye un índice del metabolismo basal (Haley y cols., 1953).

7. Una Tasa de Desaparición Biológica Final descrita por una exponencial simple:

En una persona normal, la pendiente de la curva de dilución final del Tritio, tras conseguirse el equilibrio, puede describirse por una exponencial simple con un solo valor de K que describirá la vida media del HTO en el organismo.

3.6. Toxicología del Tritio.-

Cuando se trata de experimentación en seres humanos conviene discutir brevemente este apartado para evaluar con exactitud el posible riesgo al que están sometidos los sujetos al inyectarles una dosis de agua tritiada. Al principio de la utilización del tritio como trazador se miraron con ciertas precauciones y alarma (Pinson, 1952) los posibles peligros para los sujetos experimentales derivados de la irradiación de los tejidos por las partículas beta emitidas por el tritio.

De Long y cols. (1951), en un caso de exposición accidental a vapor de HTO, Brues (1952) en un estudio sobre la toxicidad del HTO en ratones y Prentice y cols. (1952) y Pinson y Langham (1957) en sus estudios de determinación del volumen de agua corporal por dilución de agua tritiada, estudiaron este peligro de irradiación, dando Pinson y Langham (1957) una cifra de 3,7 miliCurios como la dosis máxima permisible de HTO en administración única, valor que era 3 veces la dosis máxima permitida por las recomendaciones de la "International Comisión on Radiological Protection" in 1956.

Vennart en 1969 ha revisado los estudios previos sobre este punto y las recomendaciones de la comisión antes citada en 1966 y sugiere una entrada máxima en el organismo de 50 miliCurios, por año. Lo que indica el riesgo casi nulo producido por las estimaciones de agua corporal, en que la dosis habitual es 2 miliCurios (0,5 mC en nuestro método).

CAPITULO SEGUNDO.-

TEORIA Y USO DE LOS TRAZADORES EN LA DETERMINACION DE
VOLUMENES DE DISTRIBUCION Y TASAS DE TRANSFERENCIA IN-
TERCOMPARTIMENTALES EN SISTEMAS BIOLOGICOS.-

1. CONCEPTO DE TRAZADOR.-

1.1. Historia.-

En el campo de la Fisiología, los métodos de dilución de indicadores o trazadores han sido utilizados durante un largo tiempo por los fisiólogos del aparato circulatorio, habiendo sido Keith, Rowntree y Geraghty (1915) los pioneros en el uso del principio de dilución en el estudio de la composición corporal total utilizando un colorante rojo para medir el volumen plasmático.

Tras los colorantes usados en los estudios del aparato circulatorio, vinieron los trazadores isotópicos a partir de las investigaciones de George Hevesy con los isótopos radioactivos naturales del plomo y del bismuto. En 1920 empezó a usar estos isótopos en campos tan diversos como el estudio de las reacciones químicas de intercambio en solución y de la autodifusión de los metales; tres años más tarde inició el uso de estos trazadores en la materia viva, usando el Torio B para estudiar el ingreso y la translocación del plomo en las

plantas; y un año después realizó el primer estudio de dilución de un trazador isotópico en animales, utilizando Radio D y E como trazadores en el estudio de la distribución del Flomo y el Bismuto, respectivamente, en el organismo animal (Hevesy, 1948).

Hasta el descubrimiento de la radioactividad artificial en los elementos ligeros por Joliot y Curie en 1934, las posibilidades de usar los isótopos radioactivos naturales como trazadores eran bastante limitadas, debido al pequeño número disponible de tales isótopos y a su relativa falta de importancia en los procesos corporales.

Los isótopos radioactivos artificiales cambiaron este panorama dando lugar a una tremenda expansión de las técnicas de trazadores (Sacks, 1953). El primer experimento con tal tipo de isótopos radioactivos fué, nuevamente, realizado por Hevesy (1935) en un estudio de la distribución corporal del fósforo radioactivo inyectado en forma de fosfato sódico.

También, en 1932 fue descubierto el Deuterio por Urey; las formas pesadas estables del Hidrógeno y del Nitrógeno hicieron posible estudiar por primera vez el comportamiento cinético de los constituyentes corporales en situaciones de estado de equilibrio y condujeron al concepto, ahora familiar pero entonces revolucionario, del estado dinámico de los componentes orgánicos a partir de

los trabajos de Schoenheimer (1942), colega de Urey en la Universidad de Columbia.

El desarrollo del ciclotón^r hizo posible producir cantidades bastante grandes de isótopos radioactivos de muchos de los elementos de importancia biológica; como resultado, estos isótopos empezaron a ser usados en experimentos con trazadores biológicos en cualquier centro donde existiera un ciclotrón. Por esa época, no existían aún modelos comerciales del contador Geiger-Müller, uno de los medios más sensibles para la medida de la radioactividad, y los otros tipos de instrumentos usados para este propósito, aunque familiares a los físicos, no eran conocidos generalmente por los biólogos, de forma que el uso de estos isótopos como trazadores se limitaba a un pequeño grupo de instituciones (Sacks, 1953).

Después de la segunda guerra mundial, sin embargo, cuando el control de la energía atómica fue transferido a la Atomic Energy Commission, el uso de isótopos radioactivos artificiales empezó a estar al alcance de un número de investigadores cada vez mayor, proceso que ha conducido a la formidable difusión de que estos isótopos gozan hoy en la investigación biológica y la medicina clínica.

Hevesy (1957) ha publicado una excelente revisión de la historia y aplicaciones de la metodología isotópica de

interés para todo el que desee profundizar en el tema.

1.2. Terminología.-

Algunas palabras se usan con significados especiales en la terminología de trazadores; otras, no son siempre utilizadas con el mismo significado por distintos autores (Zilversmit, 1960), conduciendo ambos factores, en ocasiones, a confusiones terminológicas lamentables. Brownell, Berman y Robertson (1968) han publicado una nomenclatura para cinética de trazadores, completando el esfuerzo unificador en este sentido, iniciado previamente por Robertson (1957) y Zilversmit (1960), de la que nos serviremos a continuación.

Trazador: Un trazador es una forma marcada de una sustancia. En condiciones ideales, el marcaje hace que la sustancia sea detectable por el observador sin afectar su comportamiento en el sistema sometido a estudio.

En algunos casos un isótopo de un elemento ha sido considerado como un trazador para otro elemento químicamente similar, y sustancias que no están presentes normalmente en el sistema en estudio, tales como coloides y gases inertes, pueden también ser tratadas como trazadores.

Transportador: El termino se usa en dos sentidos:

1) Material, no marcado, del mismo elemento o de uno diferente (Comar, 1955) añadido a la muestra conteniendo el trazador como una ayuda en su procesado químico (Kanen, 1948; Comar, 1955; Sacks, 1953). Una extensión lógica de este significado incluye la forma no marcada de la sustancia que está siendo trazada, que está normalmente presente en el sistema.

2) Una sustancia (generalmente desconocida o postulada) diferente, que actua como un vehículo de transporte para llevar la sustancia en estudio a través de una membrana o un limite de separación de fases (Rosenberg y Wilbrandt, 1955; Stephenson, 1962).

Generalmente, puede deducirse el sentido dado a la expresión del contexto en que está incluída.

Actividad Especifica: Expresa la relación existente entre la cantidad o concentración del trazador y la cantidad o concentración total de la sustancia estudiada (marcada más no marcada) (Kamen, 1948, Zilversmit, 1960).

Compartimento: Con propósitos matematicos, los constituyentes de un sistema biológico pueden representarse como localizados en fases o volúmenes distinguibles entre si

designados como "pools" o compartimentos. (Sheppard y Hoseholder, 1951). Un ejemplo tomado de Riggs (1970) nos ayudará a definir el concepto de compartimentos con todos sus connotaciones.

Imaginemos una cámara rectangular llena de una solución que está dividida en dos partes por una barrera extremadamente delgada que va de un lado a otro de la cámara. Supongamos que las moléculas de un soluto particular "S" pueden cruzar la barrera, a través de poros o en otra forma cualquiera, y que la solución a cada lado de la barrera está tan bien agitada que cuando "S" es añadida a cualquier lado de la cámara, inmediatamente alcanza una concentración uniforme en ese lado.

Pero, debido a la barrera, no tiene lugar la mezcla instantánea con el líquido del otro lado, sino que "S" necesita un tiempo mensurable para alcanzar un estado de equilibrio a través de la barrera. Bajo estas circunstancias podemos decir que la barrera divide a la cámara en dos compartimentos distintos, cuya altura, anchura y profundidad podríamos medir si quisieramos. Es decir son entidades físicas reales.

Sin embargo, no es su realidad física lo que los identifica como compartimentos distintos, en el sentido en que se usa este termino en cinética de trazadores, sino

que están definidos por el comportamiento de "S" en el sistema.

Si la barrera estuviese perforada con grandes poros en for que la mezcla de "S" a ambos lados de la barrera fuera completa antes de que pudieramos medir la concentración de "S" en cualquiera de ellos, entonces, en lo que a nuestro estudio de "S" se refiere, las dos partes de la cámara formarían un solo compartimento.

En análisis compartimental está justificado hablar de dos compartimentos solo cuando se puede investigar realmente la tasa de transferencia de "S" de un lado a otro.

(Atkins, 1969)

Otro ejemplo de Riggs (1970) no permitirá una extensión del significado del término compartimento.

Parte del iodo en el plasma sanguíneo se encuentra en la forma química del ion iodo inorgánico, y otra parte como iodo orgánico en la hormona tiroidea, principalmente la tiroxina. No hay un intercambio de iodo entre estas dos formas excepto a través de la síntesis o la degradación de la hormona, en el tiroides y los tejidos respectiva_mente.

Así, para una descripción matemática del metabolismo del

iodo, es conveniente considerar el iodo inorgánico en todo el cuerpo, y el iodo hormonal en todos los tejidos extratiroideos como existiendo en dos compartimentos separados, aunque físicamente ambas formas pueden estar juntas en el plasma u otros líquidos corporales.

De acuerdo con lo anterior, Riggs (1970) ha definido el término compartimento como sigue:

"Si una sustancia, S, está presente en un sistema biológico en varias formas o localizaciones distinguibles entre si, y si S pasa de una forma o localización a otra forma o localización de una manera mensurable, entonces cada forma o localización constituye un compartimento separado para "S".

Un requerimiento básico para la definición de compartimento es que la sustancia "S" en una parte del compartimento debe ser capaz de intercambiarse lo bastante rápidamente con la "S" en cualquier otra parte del compartimento, de forma que no tengamos que preocuparnos sobre el transporte de "S" dentro del compartimento.

Si "S" fuera distribuída demasiado lentamente, (Wrenshall, 1955) deberíamos postular no uno sino dos o más compartimentos diferentes. Esto no quiere decir que la concentración de "S" deba ser necesariamente uniforme a traves

del compartimento sino que si un pequeño incremento de "S" fuera añadido a una parte del compartimento, la "S" añadida se distribuiría rápidamente por todo él, en forma que la concentración de "S" en cualquier parte del compartimento experimentaría el mismo incremento proporcional. En este ejemplo de Riggs, podemos equiparar "S" con el trazador aunque también podríamos hacerlo con la sustancia no marcada.

Volumen de distribución: Como un compartimento único puede consistir de regiones con diferentes actividades específicas del trazador (Sheppard, 1962), es necesario elegir una de sus actividades específicas regionales como un standard de referencia y pretender que el trazador tiene una actividad específica uniforme en todo el compartimento e igual a la actividad específica del trazador en la región de referencia. Esta asunción permite definir el volumen del compartimento como el volumen que tendría si todo el trazador contenido en él estuviera realmente distribuido a una actividad específica uniforme igual a la de la región de referencia. (Riggs, 1970)

El volumen compartimental imaginario así definido, dividiendo la cantidad total de trazador administrado por la actividad específica del trazador en una región del compartimento, es lo que se llama volumen de distribución.

Transferencia: Este término define un proceso unidirec_

cional de entrada o salida de sustancia en el comparti_
mento que se traducirá en un incremento o disminución de
la misma dentro del compartimento (Sheppard, 1948).

Intercambio: Implica una sustitución "uno por uno" de
átomos o moléculas, o transferencias iguales y simultáneas
dentro o fuera de un compartimento (Sheppard y Householder,
1951; Zilversmit y cols., 1943).

Transporte Activo: Se usa cuando en las transferencias
efectuadas hay envuelta alguna otra fuente de energía
(como p.e. el valor negativo del potencial electroquími_
co) en adición a la fuerza de difusión (Rosenberg, 1954).

En un sistema multicompartimental sin ningún tipo de res_
tricciones, hay transferencias directas de sustancias en
cada compartimento a partir de todos los otros compartimen_
tos en el sistema. (Figura 2-a)

En otro tipo de sistemas, de intercambio restringido,
las transferencias o intercambios se efectúan entre com_
partimentos colocados uno al lado de otro, denominándose
sistemas catenarios (Sheppard y Householder, 1951) o en
serie (Renkin, 1955; Solomon y Gold, 1955) en contraste
con los sistemas mamilares (Sheppard y Householder, 1951),
de intercambio central (Lax y cols., 1956) o en paralelo
(Riggs, 1954; Solomon y Gold, 1955) que tienen un compar_
timento central único en intercambio con múltiples compar_

timentos periféricos entre los que no se realizan transferencias directas. (Fig. 12-b)

Otra base de clasificación sería de compartimentos o sistemas "abiertos" o "cerrados" según que exista o no pérdida irreversible de sustancia desde uno o más de los compartimentos del sistema.

Equilibrio y Estado de Equilibrio: Con estos dos términos traduciremos en lo sucesivo las expresiones inglesas "equilibrium" y "steady state", de amplio uso en el análisis compartimental.

La elección de "estado de equilibrio" para traducir "steady state" quizá no sea muy afortunada y pueda prestarse a confusiones, pero no hemos encontrado otra que sugiriese el balance dinámico que la expresión inglesa designa, sin tener connotaciones de estaticidad.

El término "estado de equilibrio" se aplica a los compartimentos en los que las tasas de salida de las sustancias siendo estudiadas son igualadas por sus tasas de entrada (Krebs 1953), de manera que las concentraciones y cantidades siendo estudiadas son constantes durante el periodo de observación. En los tratamientos matemáticos de esta situación generalmente se especifican o implican tasas de transferencia constantes, aunque no son requeridas

por la definición de estado de equilibrio. Es importante distinguir de este concepto el de "equilibrio" (Riggs, 1970) que podríamos definir diciendo que "un compartimento A, está en equilibrio con un compartimento B, cuando la transferencia neta de sustancia entre ellos es cero", es decir cuando la transferencia de A a B es igual a la transferencia de B a A, Así pues mientras que el concepto de "estado de equilibrio" puede aplicarse a un solo compartimento, el de "equilibrio" requiere al menos dos de ellos, conectados de forma que pueda haber transferencia entre ambos en las dos direcciones.

Renovación (Turnover): Los procesos de intercambio o transferencia entre compartimentos producen una renovación de la sustancia en un compartimento dado. (Lax y cols, 1953; Zilversmit y cols, 1943).

El tiempo de renovación. (Turnover time) será el intervalo de tiempo requerido para que la cantidad de una sustancia transferida dentro o fuera de un compartimento en estado de equilibrio sea numericamente igual a la cantidad presente en el compartimento (Comar, 1955; Zilversmit y cols, 1943).

La Tasa de Renovación (Turnover rate) se ha usado corrientemente en dos sentidos:

1) como el recíproco del tiempo de renovación, o fracción por unidad de tiempo, dando a la tasa de renovación las

unidades de tiempo (Kleiber, 1955; Zilversmit, 1960).

2) como la cantidad de sustancia que es renovada por unidad de tiempo, dando a la tasa de renovación las unidades de masa-tiempo (Kleiber, 1955; Zilversmit, 1960).

En general cuando se usa con el primer sentido se la designa en las expresiones matemáticas con el símbolo "K" y, en el segundo caso, con el símbolo "F".

1.3. Asunciones Básicas en la Cinética de Trazadores

Identidad cinética del Trazador y el Transportador

Esta asunción de comportamiento idéntico al trazador y la sustancia bajo estudio se aplica solo al nivel de las unidades más pequeñas que es posible reconocer generalmente átomos y moléculas (Atkins, 1969).

En condiciones que hagan esta asunción válida, las aparentes diferencias de comportamiento que puedan observarse, no indicarán un fallo del trazador para cumplir su misión, sino que probablemente demuestran procesos no observables sin el trazador. "El papel de la teoría de trazadores es suministrar datos por los que el comportamiento del trazador, que es observable pueda ser explicado en términos del comportamiento imposible de observar directamente de la sustancia marcada" (Robertson, 1962).

Sin embargo, pueden existir desviaciones; se ha demostrado (Pinson, 1952; Sacks, 1953; Weinberger y Porter, 1954) un efecto isotópico, especialmente en cuanto al carbono y los isótopos del hidrógeno; aunque, Siri (1949) y Paul y cols. (1956) reportaron no haber encontrado un efecto isotópico en los procesos de transferencia usando compuestos marcados con isótopos de hidrógeno. Lógicamente, cuando el átomo marcado forma parte de una gran molécula, los posibles efectos isotópicos son negligibles.

Por último, la asunción de identidad cinética Trazador-Transportador implica otra asunción de estabilidad de la composición del transportador (Solomon, 1960; Zilversmit, 1960).

Ausencia de interferencia del trazador sobre la cinética del sistema.-

La cantidad de trazador añadida debe ser lo suficientemente pequeña para que, pudiendo ser observada con exactitud, no perturbe la cinética del sistema. Asimismo el trazador debe carecer de efectos tóxicos, bien farmacológicos, o bien debidos a la radiación emitida. (Rescigno y Segre, 1966)

Homogeneidad dentro de los compartimentos.-

Como hemos dicho al definir el volumen de distribución,

generalmente se asume que dentro de un compartimento dado, la sustancia siendo estudiada está distribuida uniformemente en todos los momentos. Esta asunción implica una mezcla instantanea y homogenea dentro del compartimento, y por lo tanto ignora por completo la Ley de Difusión de Fick (Riggs, 1970), siendo quizá el punto más débil de toda la teoria de trazadores.

Como dice Robertson (1962) "... aquellos que saben lo que realmente ocurre en los sistemas biológicos, están justificados al mirar ésta como la más ultrajante asunción hecha..."

Sin embargo, los análisis basados en esta asunción de mezcla perfecta e instantanea, generalmente sirven para explicar adecuadamente los resultados de muchos experimentos con trazadores, y cuando no es así al menos suministran bases para evaluar la importancia de los factores que invalidan la asunción (Riggs, 1970). Wrenshall (1955) ha establecido las bases del trabajo para la determinación de tasas de transferencia en sistemas biológicos conteniendo compartimentos cuyos contenidos no se mezclan rapidamente.

2. ANALISIS COMPARTIMENTAL: CALCULO DE VOLUMENES DE DISTRIBUCIÓN Y TASAS DE TRANSFERENCIA INTERCOMPARTIMENTAL EN ALGUNOS SISTEMAS COMPARTIMENTALES SIMPLES.-

2.1. Símbolos.-

Antes de introducirnos en una breve descripción del tratamiento matemático de algunos modelos de compartimentos de interés para nuestro estudio, definiremos aquí los símbolos que más frecuentemente usaremos, ajustándonos a los empleados por Brownell, Berman y Robertson (1968), que en esencia coinciden con los utilizados primeramente por Robertson (1957).

S = Cantidad total de sustancia en un sistema de "n" compartimentos (simbolizados por 1, 2, ..., n) para un instante dado (medida en unidades de masa).

V = Volumen total de Distribución del trazador en un sistema de "n" compartimentos para un instante dado (Es un concepto igual a "S" pero medido en unidades de volumen).

S_n = Fracción de S existente en el compartimento "n";

$$S_1 + S_2 + \dots + S_n = S$$

V_n = Volumen del compartimento "n" (Volumen de distribución del trazador). $V_1 + V_2 + \dots + V_n = V$

R = Cantidad absoluta de trazador inyectada al sistema.

R_n = Cantidad absoluta de trazador en el compartimento "n" (Actividad absoluta del trazador, medida en unidades de radioactividad, cpm, Dpm, etc.).

X_n = Actividad específica del trazador en el compartimento "n" (medida en unidades de radioactividad/unidades de masa) $X_n = R_n / S_n$

$X_{n,0}$ = Actividad específica del trazador en el compartimento "n" a tiempo cero.

X_E = Actividad específica del trazador en el compartimento "n" a tiempo "infinito" (Actividad Específica en Equilibrio).

C_n = Concentración del trazador en el compartimento "n" (medida en unidades de radioactividad/unidades de volumen) $C_n = R_n/V_n$

$C_{n,0}$ = Concentración del trazador en el compartimento "n" a tiempo cero.

C_E = Concentración del trazador en el compartimento "n" a tiempo "infinito" (Concentración en Equilibrio).

$F_{1,2}$ = Tasa de transferencia desde el compartimento 1 al compartimento 2 (medida en unidades volumen/unidades tiempo).

$f_{1,2}$ = Tasa de transferencia desde el compartimento 1 al compartimento 2 (medida en unidades de masa / unidades tiempo).

$K_{1,2}$ = Constante de transferencia desde el compartimento 1 al compartimento 2 definida como

$$K_{1,2} = F_{1,2} / V_1 \text{ y medida en unidades de tiempo}$$

t = Tiempo

r_n = Constante exponencial en el n-esimo término exponencial de la ecuación describiendo el comportamiento observable experimentalmente del trazador (ecuación de solución)

A,B,C... = Coeficientes de los términos exponenciales en las ecuaciones de solución.

matemáticas

No vamos a describir aquí las técnicas usadas en el desarrollo de las bases teóricas para la interpretación del comportamiento de los trazadores puesto que todas ellas, Ecuaciones Diferenciales Lineales, Transformadas de Laplace, Matrices y Determinantes etc., son suficientemente conocidas. En cualquier caso, las soluciones analíticas para una serie de sistemas compartimentales relativamente simples han sido ya publicadas por diversos autores (Robertson, 1957; Skinner y cols, 1959; Atkins, 1969), y en lo que se refiere a los sistemas compartimentales más complejos requieren el uso de computadores analógicos o digitales para su solución. (Abrams, 1969)

Nos limitaremos a describir, siguiendo a Robertson (1962), el análisis de algunos de los modelos de compartimentos más simples que nos sirvan de base para una posterior discusión de nuestros resultados.

2.2. Sistema Bicompartimental Cerrado.-

Para simplificar nuestro análisis, al menos por el momento, haremos las siguientes asunciones:

1. El tamaño (volumen o masa) de cada compartimento permanece constante. Es decir, cualquier ecuación expresando la cantidad de trazador (R) en un compartimento dado como una función del tiempo, puede convertirse a una ecuación expresando la actividad específica (X) o la con

centración del trazador (C) en el compartimento como una función del tiempo, dividiendo ambos lados de la ecuación por S o V del compartimento.

2. Cada compartimento está bien agitado, de forma que cualquier cantidad de trazador que entre al compartimento es distribuída instantaneamente a través de todo el compartimento.

3. Las tasas de transferencia intercompartimentales permanecen constantes en el tiempo.

Aunque en buena lógica deberíamos comenzar por el sistema compartimental más simple (es decir, el formado por un solo compartimento), estudiaremos primeramente el sistema bicompartimental cerrado, puesto que, su análisis matemático es solo ligeramente más difícil, y que el sistema abierto de un compartimento puede considerarse como un caso especial del sistema bicompartimental cerrado en el que el segundo compartimento es de volumen infinito.

Aunque el objeto del análisis compartimental es desarrollar un procedimiento para deducir las propiedades del sistema a partir del comportamiento de un trazador en él, (Robertson, 1962), vamos a empezar con el problema inverso, o sea, predecir el comportamiento de un trazador en este sistema.

Hemos dicho que es un sistema cerrado, en el que no hay

pérdida irreversible de sustancia fuera del sistema. En estas condiciones podemos representarlo por el modelo $1 \Rightarrow 2$. Es decir, la única salida de sustancia del compartimento 1 está definida por su tasa de transferencia al compartimento 2, $F_{1,2}$ de acuerdo con la definición de símbolos precedentes, y la única salida de sustancia del compartimento 2 será $F_{2,1}$. (Figura 3)

A las tres asunciones hechas previamente, añadiremos la de que el sistema está en estado de equilibrio; para ca da uno de los compartimentos la cantidad de sustancia que sale es igual a la que entra, siendo entonces

$$F_{1,2} = F_{2,1}$$

Siendo V_1 y V_2 los volúmenes de los compartimentos 1 y 2, sus constantes de transferencia serán

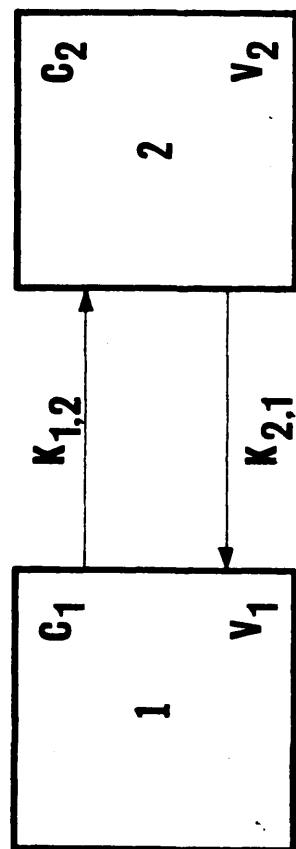
$$K_{1,2} = F_{1,2} / V_1 \quad \text{y} \quad K_{2,1} = F_{2,1} / V_2 \quad (1.)$$

Si ahora introducimos en el compartimento 1 una cantidad de trazador R , tendremos que tenderá a repartirse entre ambos compartimentos, siendo definida la concentración o actividad específica del trazador en los compartimentos por las ecuaciones:

$$\begin{array}{ll} X_1(t) = R_1(t) / S_1 & \text{ó} \quad C_1(t) = R_1(t) / V_1 \\ X_2(t) = R_2(t) / S_2 & \text{ó} \quad C_2(t) = R_2(t) / V_2 \\ X_0 = R / S_1 & \text{ó} \quad C_0 = R / V_1 \end{array}$$

(2.)

FIGURA 3



SISTEMA BICOMPARTIMENTAL CERRADO

C_1, C_2 = Concentración del trazador en los Compartimentos 1 y 2

V_1, V_2 = Volúmenes de los Compartimentos 1 y 2

$K_{1,2}, K_{2,1}$ = Constantes de Transferencia Intercompartimentales

Recordando lo que dijimos previamente sobre la identidad cinética del trazador y el transportador, asumimos que las constantes de transferencia ya definidas se aplican también al trazador, en forma que la concentración (o actividad específica) del trazador en el flujo de salida de un compartimento en cualquier momento es igual a la concentración del trazador dentro del compartimento en ese momento.

Siendo el sistema cerrado, la evolución de la concentración del trazador en los compartimentos 1 y 2 viene dada por las ecuaciones diferenciales:

$$\begin{aligned} dV_1 \cdot C_1 / dt &= -F_{1,2} \cdot C_1 + F_{2,1} \cdot C_2 \\ dV_2 \cdot C_2 / dt &= F_{1,2} \cdot C_1 - F_{2,1} \cdot C_2 \end{aligned} \quad (3.)$$

Según las definiciones de C_1 y C_2 tenemos:

$$\begin{aligned} dR_1 / dt &= -F_{1,2} \cdot (R_1 / V_1) + F_{2,1} \cdot (R_2 / V_2) \\ dR_2 / dt &= F_{1,2} \cdot (R_1 / V_1) - F_{2,1} \cdot (R_2 / V_2) \end{aligned} \quad (4.)$$

que pueden sustituirse por:

$$\begin{aligned} dR_1 / dt &= -K_{1,2} \cdot R_1 + K_{2,1} \cdot R_2 \\ dR_2 / dt &= K_{1,2} \cdot R_1 - K_{2,1} \cdot R_2 \end{aligned} \quad (5.)$$

Sumándolas miembro a miembro veremos que se cumple la condición de sistema cerrado impuesta al principio

$$dR_1/dt + dR_2/dt = 0$$

o sea

$$R_1 + R_2 = \text{Constante} = R$$

Siendo R la cantidad total de trazador inyectado en el sistema, como ya dijimos.

Las ecuaciones: $dR_1/dt = -K_{1,2} \cdot R_1 + K_{2,1} \cdot R_2$

$$dR_2/dt = K_{1,2} \cdot R_1 - K_{2,1} \cdot R_2$$

se resuelven como ecuaciones diferenciales simultaneas.

Para ello pueden usarse varios métodos. Siguiendo a Robertson (1962), utilizaremos la transformación de Laplace para convertir el sistema de ecuaciones diferenciales en uno de ecuaciones algebraicas que pueden resolverse como tales.

Siendo $R_{1,0} = R_{2,0}$ las cantidades de trazador en los compartimentos 1, 2 en el instante de la inyección (a tiempo cero) y teniendo en cuenta que la inyección se realiza en el compartimento 1, para $t = 0$, $R_{1,0} = R$ y $R_{2,0} = 0$

Las transformaciones de Laplace de ambas ecuaciones son:

$$(s + K_{1,2}) R_1(s) - K_{2,1} \cdot R_2(s) = R_{1,0}$$

$$-K_{1,2} \cdot R_1(s) + (s + K_{2,1}) R_2(s) = R_{2,0} \quad (6.)$$

Evolución del trazador en el compartimento 1

Resolviendo estas ecuaciones algebraicamente para:

$R_1(s)$, siendo $R_1(s) = L[R_1(t)]$

$$R_1(s) = \frac{\begin{vmatrix} R_{1,0} & -K_{1,2} \\ R_{2,0} & s + K_{2,1} \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} s + K_{1,2} & -K_{2,1} \\ -K_{1,2} & s + K_{2,1} \end{vmatrix}} = \frac{S \cdot R_{1,0} + K_{2,1} \cdot R_{1,0} + K_{1,2} \cdot R_{2,0}}{s^2 + (K_{1,2} + K_{2,1})s}$$

que puede simplificarse a:

$$R_1(s) = \frac{R_E}{s} + \frac{R_{1,0} - R_E}{s + K_{1,2} + K_{2,1}}$$

siendo R_E (Cantidad de trazador en equilibrio) definido como:

$$R_E = (R_{1,0} + R_{2,0}) / (V_1 + V_2)$$

es decir:

$$R_E = R / (V_1 + V_2)$$

La aplicación de la transformación inversa nos da:

$$R_1(t) = R_E + (R_{1,0} - R_E) e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t} \quad (7.)$$

llamando a $(R_{1,0} - R_E)$, A, y a $(K_{1,2} + K_{2,1})$, r, tendremos:

$$R_1(t) = A \cdot e^{-rt} + R_E \quad (8.)$$

Es decir, la cantidad total de trazador en el compartimento 1 disminuye de forma exponencial siendo $R_{1,0} - R_E$ la ordenada en el origen de la exponencial, $K_{1,2} + K_{2,1}$, su periodo, y R_E su asíntota. Fig II-2

Evolución del trazador en el compartimento 2

La solución del sistema de ecuaciones algebraicas

$$(s + K_{1,2}) R_1(s) - K_{2,1} \cdot R_2(s) = R_{1,0}$$

$$-K_{1,2} \cdot R_1(s) + (s + K_{2,1}) \cdot R_2(s) = R_{2,0}$$

para $R_2(s)$ siendo $R_2(s) = L R_2(t)$, nos da:

$$R_2(s) = \frac{\begin{vmatrix} s + K_{1,2} & R_{1,0} \\ -K_{1,2} & R_{2,0} \end{vmatrix}}{\begin{vmatrix} s + K_{1,2} & -K_{2,1} \\ -K_{1,2} & s + K_{2,1} \end{vmatrix}} = \frac{(s + K_{1,2}) \cdot R_{2,0} + K_{1,2} \cdot R_{1,0}}{s^2 + (K_{1,2} + K_{2,1}) s}$$

y su transformación inversa nos dará:

$$R_2(t) = R_E + (R_{2,0} - R_E) e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t} \quad (9.)$$

que nos define la evolución del trazador en el compartimento

mento 2. Siendo también una curva exponencial con período, $K_{1,2} + K_{2,1}$, igual al del compartimento 1.

Ahora bien, como dijimos, la inyección del trazador se realiza en el compartimento 1 por lo que en los instantes iniciales no habrá trazador en el compartimento 2, es decir, para $t = 0$, $R_{2,0} = 0$, resultando entonces:

$$R_2(t) = R_E (1 - e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t}) \quad (10.)$$

Es decir, $R_2(t)$ aumenta exponencialmente con una pendiente, $K_{1,2} + K_{2,1}$, desde un valor cero, en el momento de la inyección, a un valor R_E , al alcanzar el equilibrio, manteniéndose constante en dicho valor posteriormente. Figura 4.

Teniendo en cuenta la asunción de volumen constante podemos sustituir las ecuaciones:

$$R_1(t) = R_E + (R_{1,0} - R_E) e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t}$$

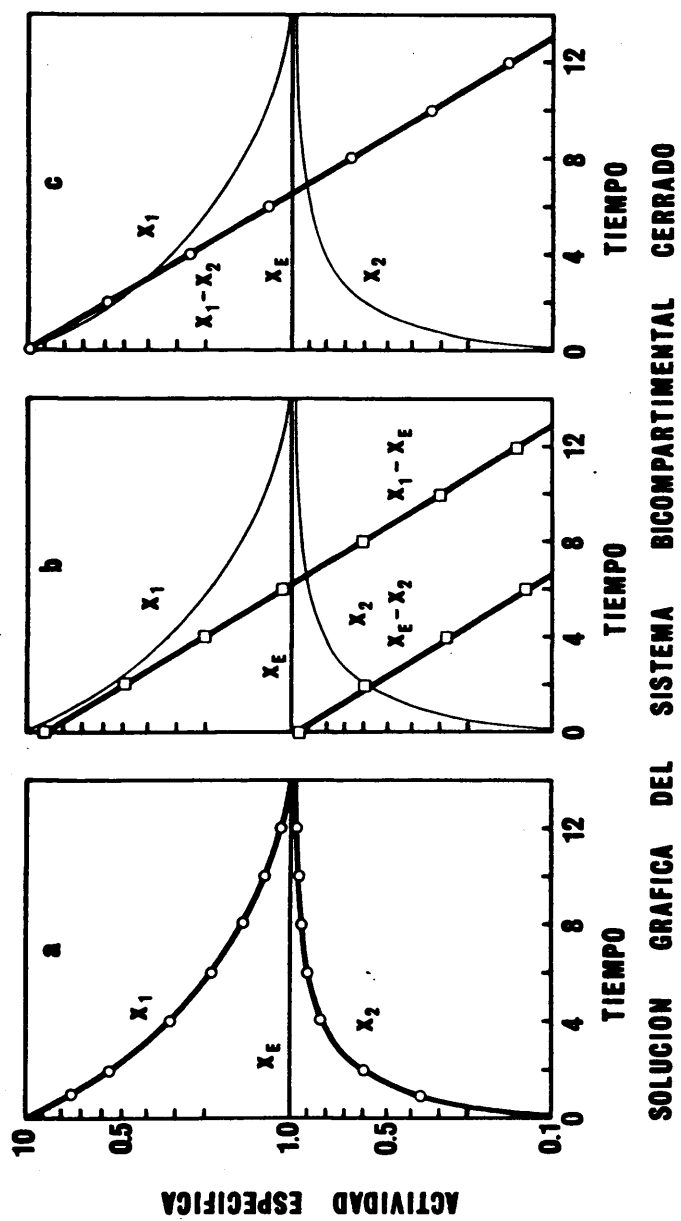
$$R_2(t) = R_E (1 - e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t})$$

por estas otras

$$C_1(t) = C_E + (C_{1,0} - C_E) e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t} \quad (11.)$$

$$C_2(t) = C_E (1 - e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t}) \quad (12.)$$

FIGURA 4



- x_1 = Actividad Especifica del Trazador en el Compartimento 1
 x_2 = Actividad Especifica del Trazador en el Compartimento 2
 x_3 = Actividad Especifica en el Equilibrio

que expresarán la evolución de la concentración de la actividad específica en compartimentos 1 y 2.

El término C_E expresará la concentración o actividad específica en el equilibrio, que en este contexto se refiere a equilibrio isotópico y no implica necesariamente equilibrio termodinámico. (Sheppard, 1962)

Las ecuaciones descritas sirven para predecir el comportamiento de un trazador en un sistema de dos compartimentos en términos de los parámetros del sistema. Su aplicación al problema inverso de deducir los parámetros del sistema a partir del comportamiento observado del trazador se realiza como sigue (Robertson, 1962).

Los datos experimentales se representan sobre papel semi logarítmico como se muestra en la figura III-4a y se dibujan curvas regulares que se ajusten a los puntos representados.

Si las curvas obtenidas son similares a las que hemos dicho que describen la evolución del trazador en un sistema bicompartimental cerrado, entonces podemos decir que este modelo compartimental representa el sistema biológico que estamos estudiando.

Si los datos de los dos compartimentos se aproximan al

mismo valor, llegando suficientemente cerca de él como para permitir una estimación correcta de C_E (o R_E), este valor se sustrae de los valores de la curva que se aproxima a C_E desde arriba (la exponencial decreciente), y los valores de la curva que se aproxima a C_E desde abajo (la exponencial creciente) son sustraídas de C_E dando las 2 líneas marcadas como $(C_1 - C_E)$ y $(C_E - C_2)$.

Si los datos son consistentes con las asunciones hechas para el sistema de dos compartimentos postulados, estas dos líneas tendrán la misma pendiente.

Si no ha sido posible obtener datos durante un periodo de tiempo suficientemente largo para establecer C_E ; un gráfico de la diferencia entre C_1 y C_2 debería dar la misma pendiente, ya que según las ecuaciones desarrolladas tenemos que:

$$\begin{aligned} C_1 &= C_E + (C_{1,0} - C_E) e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t} \\ C_2 &= C_E + (C_{2,0} - C_E) e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t} \\ C_1 - C_2 &= (C_{1,0} - C_{2,0}) e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t} \end{aligned} \quad (13.)$$

Este último método tiene la ventaja de evitar el efecto del error cometido al estimar C_E , pero tiene la desventaja de no incluir la prueba de consistencia entre el modelo teórico y el sistema real que suministra la comparación de ambas pendientes (Robertson, 1962).

El número más frecuentemente usado para caracterizar la pendiente es el Tiempo de Vida Media Biológica del trazador, (que no debe confundirse con el tiempo de vida media del "decay" radioactivo) que es el intervalo de tiempo en que cualquier valor de C, R, o X, decae a la mitad. El Tiempo de Vida Media ($T^{1/2}$) está relacionado con el período de la exponencial en la forma:

$$r = \ln 2 / T^{1/2} = 0,693 / T^{1/2}$$

siendo $r = K_{1,2} - K_{2,1}$, como definimos anteriormente.

El volumen del compartimento 1 se determina a partir de la ecuación de dilución:

$$C_{1,0} = R_{1,0} / V_1 = R / V_1$$

$$V_1 = R / C_{1,0}$$

Es decir, si nuestra curva está definida por una ecuación de la forma:

$$C_1(t) = A \cdot e^{-rt} + B$$

equivalente a:

$$C_1(t) = (C_{1,0} - C_E) e^{-(K_{1,2} + K_{2,1})t}$$

y en la que, por tanto,

$$A + B = C_{1,0} = (C_{1,0} - C_E) + C_E$$

$$r = K_{1,2} + K_{2,1}$$

$$r \cdot B = K_{2,1}$$

$$K_{1,2} = r - K_{2,1}$$

conociendo los parámetros de la curva A y B y la cantidad de trazador inyectado se puede determinar V_1

$$V_1 = R / A + B$$

Conocido V_1 , la transferencia intercompartimental de trazador $F_{1,2}$, se calcula a partir de la fórmula

$$F_{1,2} = K_{1,2} \cdot V_1$$

El volumen del compartimento 2 podemos calcularlo a partir de la concentración en el equilibrio, C_E , y la cantidad de trazador inyectada.

$$V_{1+2} = R / C_E = R / B = \text{Actividad Inyectada}$$

Ordenada en el origen de la
asíntota a ambas curvas.

$$V_2 = V_{1+2} - V_1$$

y la transferencia intercompartimental es:

$$F_{2,1} = K_{2,1} \cdot V_2$$

Con lo que quedan definidos los parametros estáticos, V_1 , y V_2 , y dinámicos, $F_{1,2}$ y $F_{2,1}$, del sistema.

Si los puntos $C_1 - C_2$, $C_1 - C_E$, $C_E - C_2$, no se ajustan a una línea recta al representarlos sobre papel semilogarítmico, ello nos sugiere la necesidad de usar otro modelo más complejo para interpretar los datos.

2.3. Sistema Abierto de un Compartimento

Si en el sistema descrito hasta ahora consideramos al compartimento 2 como teniendo un volumen infinito,

$$K_{2,1} = F_{2,1} / V_2 = 0$$

La constante de transferencia $K_{2,1}$ se hace cero, y la constante de transferencia $K_{1,2}$, se convierte en una constante de aclaramiento expresando el "lavado" del trazador por el flujo de salida compartimental. (Figura 5)

En estas condiciones tenemos que:

$$dR_1 / dt = - F_{1,2} \cdot C_1$$

$$d(R_1 / V) / dt = - F_{1,2} / V_1 = C_1$$

$$dC_1 / dt = - K_{1,2} \cdot C_1$$

cuya integración nos proporciona la ecuación exponencial:

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-Kt} \quad (14.)$$

que nos dice que la concentración (o actividad específica) del trazador disminuye exponencialmente con el tiempo en un sistema de un compartimento abierto.

Si nuestros datos experimentales en un sistema biológico, al representarlos graficamente se ajustan a una curva exponencial decreciente, podemos afirmar que el sistema en cuestión está constituido por un compartimento único abierto. (Fig. 5)

La ecuación presentada correspondería al caso de que el trazador estuviese presente inicialmente en el compartimento y no hubiese trazador en el flujo de entrada que irá "aclarando" al trazador. Es decir, sería el caso de una inyección intravenosa aislada de trazador para determinar volumen plasmático, por ejemplo.

El caso opuesto correspondería a la situación de que no hubiese ningún trazador en el compartimento inicialmente, sino que este penetrase con el flujo de entrada; sería el caso, p.e., de una infusión intravenosa continua de inulina para determinar el volumen de L.E.C.

Para este caso la ecuación que nos describiría el cambio en la concentración de trazador en el compartimento sería:

$$C(t) = C_E (1 - e^{-Kt})$$

siendo

$$K = F / V_1$$

Es decir, la concentración de trazador aumentaría exponencialmente hasta un valor, C_E , de equilibrio entre las cantidades del trazador que penetran y salen del compartimento. El volumen V_1 del compartimento vendrá dado por la ecuación de dilución:

$$V_1 = R / C_0 \quad \text{ó} \quad V_1 = R / C_E$$

Siendo R la actividad inyectada y C_0 la concentración a tiempo cero.

Determinando el $T^{1/2}$ de la exponencial, se calcula la Constante de Transferencia K ,

$$K = \ln 2 / T^{1/2} = 0,693 / T^{1/2}$$

Conocidos K y V, el flujo de salida del trazador del com
partimento vendrá dada por, $F = K \cdot V_1$

El parámetro K, o Constante de Transferencia, se calcula como vemos a partir del Tiempo de Vida Media, que puede determinarse en cualquier punto de la exponencial toman
do cualquier valor de C (t) y midiendo el intervalo de tiempo que tarde en reducirse a la mitad.

Es decir, el Tiempo de Vida Media Biológica $T^{1/2}$ y por tanto la Constante de Transferencia K, son independientes del Volumen del Compartimento. Asimismo, el volumen del compartimento no será afectado por la desaparición del trazador, puesto que ésta es debida a la renovación o "tur
nover" en el compartimento, sustituyéndose los átomos de trazador por otros de la sustancia no marcada.

La Renovación al cabo de un intervalo de tiempo igual al Tiempo de Vida Media Biológica será igual a
Renovación = $K \cdot T^{1/2} = (0,693 / T^{1/2}) \cdot T^{1/2} = 0,693 = 69,3\%$

Es decir se habrán renovado un 69,3% de la sustancia tot
tal y por tanto un 69,3% del trazador.

2.4. Sistemas Tricompartimentales y Multicompartimentales

Hemos referido con algún detalle el análisis de los sistemas de uno y dos compartimentos porque de su estudio pueden obtenerse los principios básicos aplicables a casi todos los sistemas (Atkins, 1969), siendo esencialmente el mismo el tratamiento matemático que se les aplica aunque, por supuesto, de complejidad creciente.

Al igual que los sistemas tricompartimentales, los sistemas de tres compartimentos han sido resueltos casi en su totalidad (Robertson, 1962) en el sentido de que se han publicado fórmulas para deducir los parámetros estáticos y cinéticos del sistema a partir de los datos sobre el comportamiento del trazador dentro de él. (Robertson, y cols, 1957; Skinner y cols., 1959; Solomon, 1960; Sheppard, 1962). (Figura. 6)

Perl, (1960) ha dado soluciones para un sistema cerrado de 4 compartimentos, pero después la tendencia ha sido como veremos, más bien publicar métodos de análisis de sistemas multicompartimentales que dar fórmulas explícitas, dada la enorme variedad de sistemas posibles (Whipple, 1963; Rescingno, 1966; Atkins, 1969).

La ecuación diferencial básica para determinar la actividad específica de un trazador en un compartimento cual

quiera de un sistema multicompartimental, sería una exten
sión de la forma general:

$$d(V_i X_i) / dt = - F_{i,j} X_i + F_{j,i} X_j \quad (15.)$$

siendo $F_{i,j}$ de acuerdo con Brownll y cols, (1968) la ta
sa de transferencia desde el compartimento i al compartimen
to j. Sustituyendo la tasa de transferencia F por la
Constante de Transferencia o Fracción Constante de Renovac
ión, K,

$$K_{i,j} = F_{i,j} / V_i$$

Y asumiendo mezcla perfecta, en forma que la actividad es
pecífica es la misma para todos los flujos de salida del
compartimento, se pueden sustituir todos los términos
 $F_{i,j} / V_i$ por un solo símbolo K_i o Constante K de transferencia
total, definida como

$$K_i = \sum_j F_{i,j} / V_i$$

En el estado de equilibrio también se cumpliría

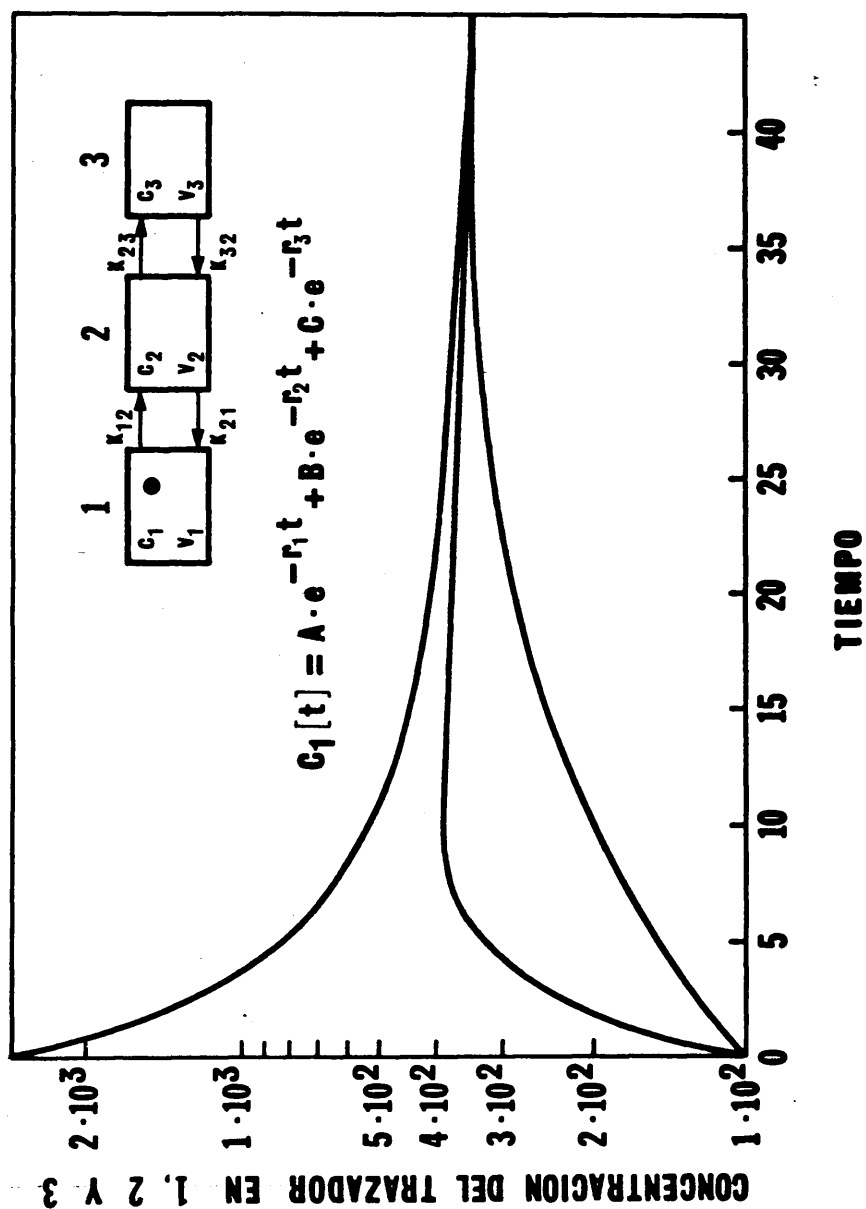
$$K_i = \sum_j F_{j,i} / V_i$$

Aunque en los sistemas que no están en estado de equilibr
io, la Tasa de Renovación no es constante y se prescinde



FIGURA 6

EVOLUCION DE LAS CONCENTRACIONES DE UN TRAZADOR
EN UN SISTEMA TRICOMPARTIMENTAL CERRADO



de de K, (Skinner, 1959).

Así, para un compartimento "i" de un sistema n - compartimental tendríamos

$$dX_i / dt = -K_i X_i + \sum_{\substack{j=0 \\ j \neq i}}^{i=n} K_{ji} X_j \quad (16.)$$

donde $j = 0$ se usa para designar el flujo de entrada en sistemas abiertos, cuando el flujo está marcado y cuando la actividad específica es constante.

Para el sistema de "n" compartimentos, habría "n" ecuaciones como la que acabamos de describir, cada una teniendo hasta $n+1$ términos.

Estas ecuaciones diferenciales lineales con coeficientes constantes y un grupo de "n" ecuaciones de ese tipo tiene como solución un grupo de "n" ecuaciones del tipo:

$$X_i = X_E + C_{i,1} e^{-r_1 t} + C_{i,2} e^{-r_2 t} + \dots + C_{i,n} e^{-r_n t} \quad (17.)$$

obtenidas a través de métodos similares a los descritos para el sistema bicompartimental.

Es decir, se tratará de sumas de exponenciales, decrecientes en el compartimento de inyección del trazador y cre-

cientes en los restantes compartimentos, que, tratándose de un sistema cerrado tenderán a equilibrarse en un valor X_E .

En los sistemas abiertos de "n" compartimentos, tendremos "n" términos exponenciales en cada ecuación y X_E (el valor en equilibrio o a tiempo infinito de todos los X) es igual a la actividad específica en el flujo de entrada, que se asume es cero o constante, mientras que en los cerrados hay solo (n - 1) términos exponenciales en adición a X_E .

No vamos a discutir la técnica de cálculo de tasas de transferencia intercompartimentales, problema que va más allá de los límites en que se mueve esta breve revisión. Diremos solo que para ello se utilizan técnicas matriciales generalmente resueltas por el uso de computadores digitales, Rescingno y cols. (1966), Whipple (1965), Sheppard (1962), Robertson (1962), y Atkins (1969) proporcionan abundante información sobre el tema.

Para sistemas de hasta tres compartimentos, el análisis de las curvas por los métodos que veremos permite determinar los periodos y ordenadas en el origen de los términos exponenciales de cada ecuación, y a partir de dichos datos es posible estimar los elementos cinéticos y estáticos del sistema.

2.5. Sistemas Abiertos: Sistema Bicompartimental Abierto, Mamilar o Catenario

Hasta aquí nos hemos referido fundamentalmente a sistemas cerrados, sin embargo la mayoría de los sistemas compartimentales biológicos son abiertos, en los que existe un flujo bidireccional entre el sistema y el exterior que se traduce en un "aclaramiento" del trazador.

Vamos a dedicar, pues, unos párrafos a los modelos más simples de sistemas compartimentales abiertos (exceptuando el de un solo compartimento que ya hemos descrito) que, al igual que en el caso de los sistemas cerrados, nos proporcionarán los elementos básicos del análisis de los sistemas más complejos.

Sistema Bicompartimental Abierto: Mamilar o Catenario

En ambos sistemas, el trazador, inyectado inicialmente en el compartimento 1, se equilibra con el compartimento 2, y sale irreversiblemente fuera del sistema, a partir del compartimento 1 en el sistema mamilar, y del compartimento 2 en el catenario.

Las ecuaciones describiendo la evolución del trazador en ambos compartimentos serían:

$$dC_1 / dt = -K_{1,2} \cdot C_1 + K_{2,1} \cdot C_2 - K_E \cdot C_1 \quad (18.)$$

$$dC_2 / dt = K_{1,2} \cdot C_1 - K_{2,1} \cdot C_2 \quad (19.)$$

para el sistema mamilar,

$$dC_1 / dt = -K_{1,2} \cdot C_1 + K_{2,1} \cdot C_2 \quad (20.)$$

$$dC_2 / dt = K_{1,2} \cdot C_1 - K_{2,1} \cdot C_2 - K_E \cdot C_2 \quad (21.)$$

para el sistema catenario.

Las ecuaciones exponenciales de solución para ambos casos son del tipo:

$$C_1(t) = A_1 \cdot e^{-r_1 t} + B_1 \cdot e^{-r_2 t} \quad (22.)$$

$$C_2(t) = A_2 \cdot e^{-r_3 t} + B_2 \cdot e^{-r_4 t} \quad (23.)$$

que pueden verse representados graficamente en las figuras 7 y 8.

Es decir existe una curva bie-xponencial decreciente para $C_1(t)$, y para $C_2(t)$ una curva exponencial creciente, que tras alcanzar un valor máximo decrece exponencialmente de forma paralela a $C_1(t)$. En el sistema mamilar, $C_2(t)$ al alcanzar su valor máximo está en equilibrio con $C_1(t)$ permaneciendo posteriormente con un valor superior a los de C_1 en cada instante. (Figuras. 7 y 8)

FIGURA 7

SISTEMA BICOMPARTIMENTAL ABIERTO MAMILAR Y SU SOLUCION

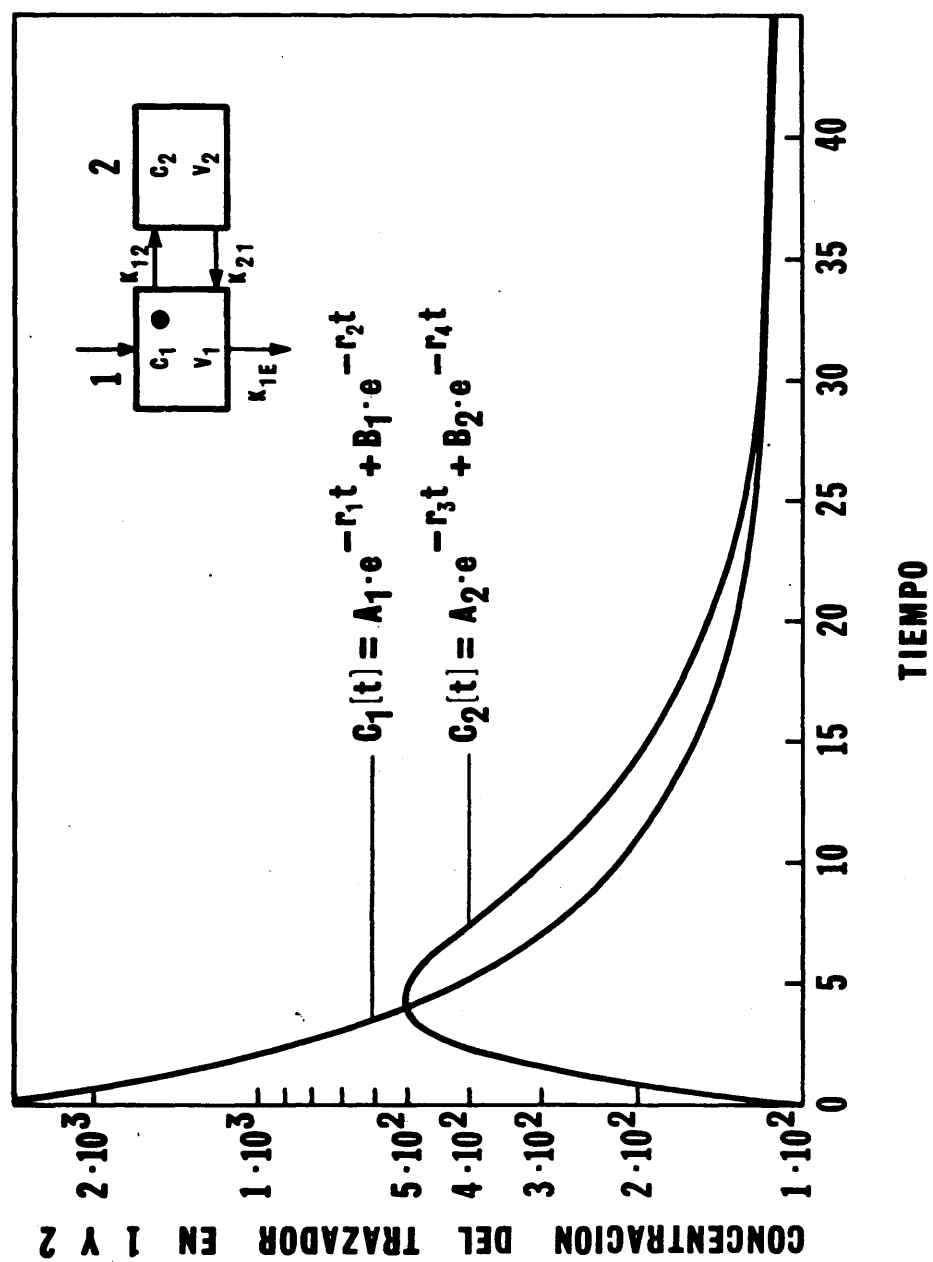
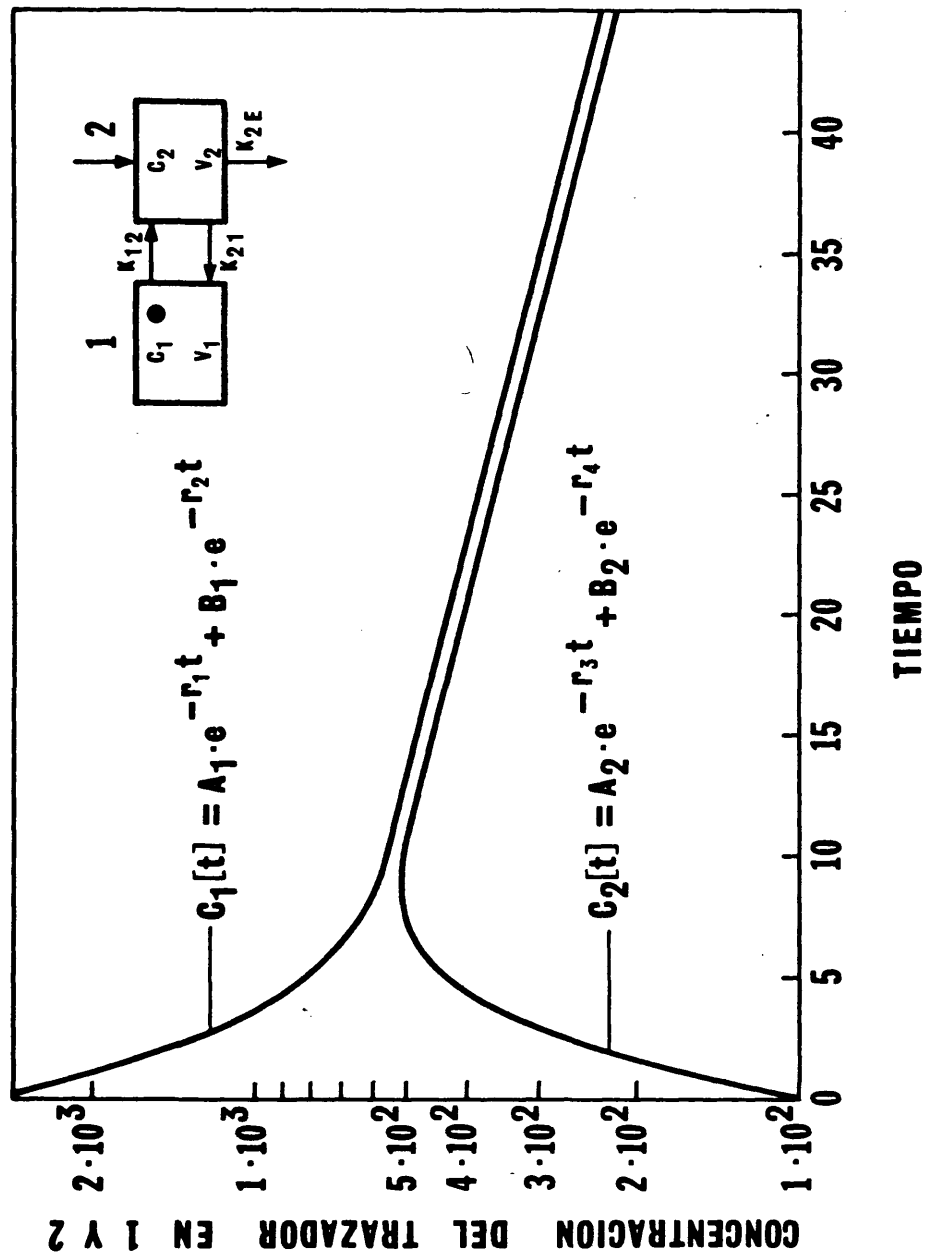


FIGURA 8

SISTEMA BICOMPARTIMENTAL ABIERTO CATENARIO Y SU SOLUCION



Riggs (1970) ha publicado una solución general al sistema abierto de dos compartimentos basada en una simplificación de la solución general dada por Skinner (1959) al sistema tricompartmental cerrado, asumiendo que el tercer compartimento es de volumen infinito.

Este sistema es^t representado en la figura 9 y puede verse que el trazador, inyectado en el compartimento 1, sale irreversiblemente del sistema a partir de los compartimentos 1 y 2.

La fracción de la dosis total de trazador inyectado, en cada compartimento, evolucionará según las ecuaciones:

$$R_1(t) = \left[\left(\frac{K_1 - K_2 + Z}{2Z} \right) \exp \left[-1/2 (K_1 + K_2 + Z)t \right] + \left(1 - \frac{K_1 - K_2 + Z}{2Z} \right) \exp \left[-1/2 (K_1 + K_2 + Z)t \right] \right] \quad (24.)$$

$$R_2(t) = (K_{1,2} / Z) \left[\exp \left[-1/2 (K_1 + K_2 - Z)t \right] - \exp \left[-1/2 (K_1 + K_2 + Z)t \right] \right] \quad (25.)$$

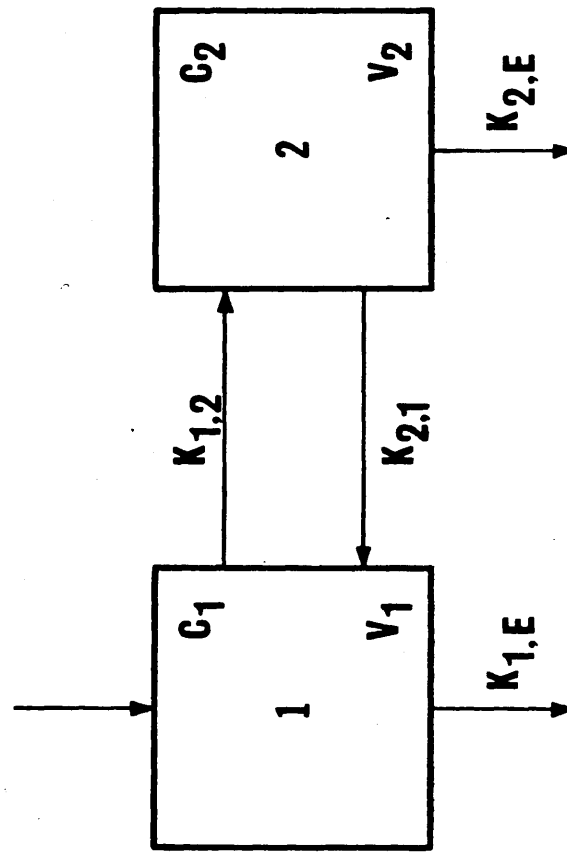
donde:

$$K_1 = K_{1,2} + K_{1E}$$

$$K_2 = K_{2,1} + K_{2E}$$

FIGURA 9

SISTEMA BICOMPARTIMENTAL ABIERTO POR LOS DOS COMPARTIMENTOS



SISTEMA BICOMPARTIMENTAL ABIERTO

K_{1E} = Constante de transferencia desde 1 al Exterior

K_{2E} = Constante de transferencia desde 2 al Exterior

$$Z = (K_1 - K_2)^2 + 4 K_{1,2} K_{2,1}$$

Condiciones iniciales, at = 0, $R_{1,0} = 1$ $R_{2,0} = 0$

Estas ecuaciones, de acuerdo con la asunción de volumen constante, pueden ser transformadas facilmente en ecuaciones para la concentración a la actividad específica del trazador.

Soluciones muy similares han sido dadas por Bischoff y Dedrick (1970) y Noordhoek (1971), aplicadas a la cinética de drogas.

3. DESARROLLO DE UN MODELO TEORICO COMPARTIMENTAL A PARTIR DE LOS DATOS OBSERVADOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE UN TRAZADOR EN UN SISTEMA BIOLOGICO.-

3.1 Ajuste de Ecuaciones Exponenciales a las Observaciones Experimentales.

Durante el análisis de un sistema biológico mediante la dilución de un trazador, obtendremos un cierto número de datos expresando las concentraciones o actividades especí

ficas del trazador en distintas subdivisiones del sistema (en todas si ello nos es posible, o en las que nos sean accesibles, en su defecto) en distintos instantes de tiempo. El problema que se plantea a continuación es el de aplicar estos datos mediante un modelo teórico compartimental, que puede estar ya perfectamente definido a través de observaciones previas, organización anatómica, etc., simplificando nuestra tarea a la determinación de los parámetros cinéticos y estáticos del sistema.

Lamentablemente, casi siempre el problema planteado estriba, en primer lugar, en definir los compartimentos del sistema y sus conexiones, y, tras ello, en analizar sus parámetros. Nos encontramos pues con una serie de puntos, expresión gráfica de la variación de la actividad específica del trazador con el tiempo, que deberemos ajustar en primer lugar a una ecuación exponencial del tipo descrito para los sistemas de uno a más compartimentos, es decir

$$X_i = X_E + C_{i1} e^{-r_1 t} + C_{i2} e^{-r_2 t} + \dots + C_{i,n} e^{-r_n t} \quad (17.)$$

El modelo teórico que elaboremos será más completo mientras más términos exponenciales podamos definir con precisión en la curva exponencial que mejor se ajuste a nuestros datos experimentales (Rubinow y Winzer, 1971).

Riggs (1970) ha estudiado con detalle la dificultad que es

to representa, a causa de la fluctuación considerable que los datos pueden presentar, debida a multiples factores, des de errores experimentales a fluctuaciones en el estado de equilibrio del sistema. (Berlin y cols, 1968).

En general puede decirse que los datos experimentales son bastante insensibles al número de términos exponenciales que puedan utilizarse en la curva exponencial (Nooney, 1965), y practicamente no es posible definir con exactitud razonable más de tres de estos términos (Perl, 1960), que estarán formando una ecuación que puede ser nada más que una de varias, con la misma forma general, pero con parámetros bastante diferentes. Por ello "... debemos ser extremadamente escépticos cuando se intenta equiparar los términos individuales de una ecuación exponencial empírica, con procesos o regiones corporales, supuestamente correspondientes." (Riggs, 1970).

Métodos de Ajuste Gráfico

No vamos a extendernos en la descripción de estos métodos por ser sobradamente conocidos ya (Strajman y cols., 1957; Sheppard, 1962; Ferracio y cols, 1968; Atkins, 1969; Riggs, 1970).

Diremos solo que se basan en la representación gráfica de la curva exponencial sobre papel semilogarítmico. A continuación asumimos que los últimos puntos de la curva repre

sentan el término exponencial "mas lento" sobre el que ya tienen poca influencia los primeros términos, y trazamos una línea recta que se ajuste a estos puntos.

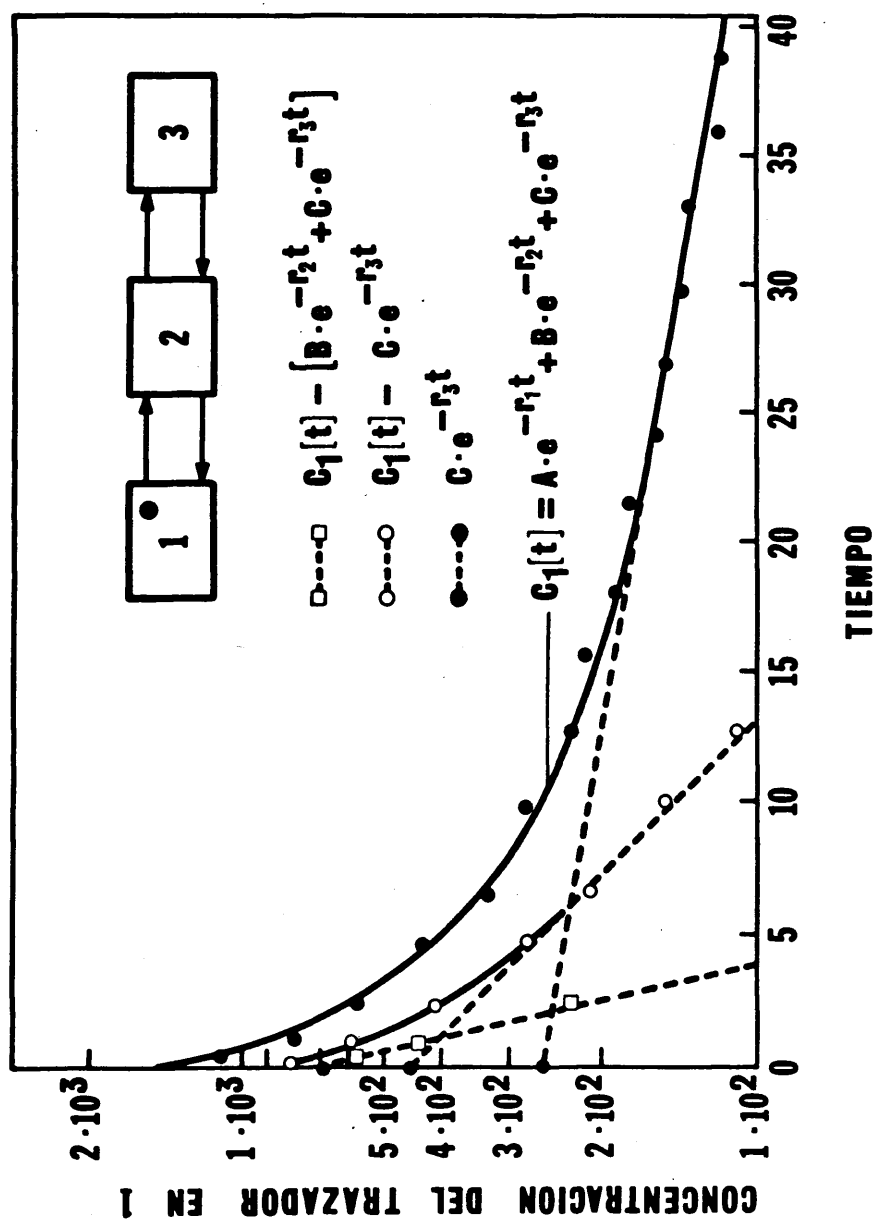
La ordenada en el origen de esta recta nos dará el coeficiente exponencial ($C_{i,n}$) y su pendiente al periodo de esta última exponencial ($r_{i,n}$).

Podemos entonces leer o calcular a partir de esta recta el valor de el último término para cada uno de los restantes puntos que estarán situados por encima de la recta. Substrayendo estos valores calculados de los valores observados, obtenemos una serie de diferencias representando otra curva exponencial, pero con un término menos. Pasando por los últimos puntos de esta curva trazaremos otra línea recta y obtendremos el término exponencial $n - 1$ y continuaremos así, hasta que los puntos que nos queden no basten a definir más que un término exponencial. (Figura. 10).

Una de las principales fuentes de error de este método (Perl, 1960; Riggs, 1970) es que no podemos estar muy seguros de que los últimos puntos de la curva no están siendo aún influenciados por más de un término exponencial, y ello especialmente cuando las pendientes de los dos últimos términos exponenciales no son muy distintas.

FIGURA 10

ANALISIS GRAFICO DE UNA CURVA TRIEXPONENCIAL



(Pedraza, 1972)

Métodos Matemáticos de Ajuste.-

El más simple es el de ajuste lineal por mínimos cuadrados, que en esencia consiste en realizar primero un análisis gráfico de la curva y una vez determinado el número de términos exponenciales, y a partir de que punto la influencia de un término sobre el siguiente se hace mínima, proceder al ajuste de las rectas, no a simple vista como en el caso anterior, sino por el método de mínimos cuadrados (Riggs, 1970; Ferrario, y cols., 1968).

El método asume una relación lineal para las constantes exponenciales y la función, cuando lo cierto es que es exponencial (Denning, 1943).

Ello obliga al uso de métodos para linearizar la relación antes de aplicar el método de mínimos cuadrados u otro método de ajuste, procedimientos en general suficientemente complicados como para requerir la ayuda de computadores digitales.

Pedraza (1972) ha publicado una excelente revisión de estos métodos, incluyendo el ajuste no lineal por mínimos cuadrados, del que también puede encontrarse amplia información en Patel (1970), Métodos Iterativos (Cornfield, 1960; Parsons, 1970) y Método de Cornell (1962) de totales parciales, haciendo un análisis de sus ventajas e inconvenientios.

tes y la mayor o menor exactitud de las estimaciones que suministran.

3.2. Medición del Volumen de Distribución

El término Volumen de Distribución lo hemos definido ya como el volumen de la solución que, si tuviese una concentración uniforme igual a $C_{R \rightarrow E}$. (Concentración de Referencia en el Equilibrio), contendría la misma cantidad total de "S" que está distribuída por todo el sistema en el equilibrio, es decir cuando no hay transferencia neta de "S" entre compartimentos.

Vamos a dedicar ahora unas líneas a considerar como se puede medir el volumen de distribución de "S", o sea, del trazador, a partir de los datos experimentales. Por supuesto, en un sistema cerrado el problema es simple, bastará con administrar una dosis conocida de trazador " R_0 " a tiempo cero y estudiar la concentración del trazador, p.e. en el plasma, $C_1(t)$, como una función del tiempo hasta tener suficientes datos para definir la concentración en equilibrio C_E a que $C_1(t)$ se aproxima asintóticamente; viniendo dado entonces el volumen de distribución del trazador por la ecuación:

$$V_{\text{dist.}} = R_E / C_E, \quad R_0 = R_E \quad (26.)$$

Generalmente, sin embargo, el trazador se pierde de manera irreversible más o menos rápidamente, así que administrando una dosis única de él no hay aproximación a un estado de equilibrio con el paso del tiempo.

Puede alcanzarse un estado de equilibrio infundiendo el isótopo intravenosamente a una tasa constante durante un largo periodo de tiempo (Sheppard, 1962), a condición de que todas las pérdidas irreversibles del trazador sean del mismo compartimento en que el trazador está siendo infundido; por ejemplo en un sistema mamilar, con los flujos de entrada y salida al sistema por el compartimento central.

En tal sistema, al infundir el trazador continuamente a una tasa de entrada constante, se acumulará en los distintos compartimentos hasta que la tasa de salida iguale a la tasa de entrada. En teoría esto ocurriría solo a tiempo infinito, pero en la práctica (Riggs, 1970) tendremos una aproximación suficiente al equilibrio en un tiempo finito, p.e. unas pocas horas.

En el equilibrio podemos usar la ecuación anterior si la cantidad de trazador en el sistema en el equilibrio R_E puede estimarse; p.e. midiendo la actividad específica en muestras seriadas de orina tomadas después de terminar bruscamente la infusión continua.

Sin embargo este método no podría ser usado para un sistema como el representado por la figura 9 , en el que parte del trazador infundido en 1 se está perdiendo por el compartimento 2.

Si el trazador se infunde continuamente a una tasa de entrada constante, este sistema se aproximará a un estado de equilibrio en el que la tasa de entrada es igualada por la tasa de salida total de 1 y 2, $(K_{1E} \cdot C_1 - K_{2E} \cdot C_2)$ siendo K_{1E} y K_{2E} las Constantes de Transferencia al exterior.

Es evidente que $K_{1,2} \cdot C_1$ debe exceder a $K_{2,1} \cdot C_2$ en una cantidad igual a $K_{2E} \cdot C_2$; luego, aunque el sistema se aproxima a un estado de equilibrio, no lo hace a un equilibrio de distribución y la ecuación anterior no puede aplicarse (Atkins, 1969).

Otro método de estimar el volumen de distribución sería calcular los volúmenes de cada compartimento individualmente a partir de la extrapolación a $t = 0$ de los términos de sus curvas exponenciales, (siempre que estos compartimentos sean accesibles a la observación) y sumar todos los volúmenes obtenidos (Sheppard, 1962).

Berman y Schoenfeld (1956) y Berman y cols. (1961) han desarrollado técnicas para calcular $C(t)$ trabajando con

datos incompletos, es decir cuando no pueden observarse directamente todos los compartimentos. Aunque Bergner (1959) (1960) postuló que los datos de un solo compartimento son generalmente inadecuados para el análisis de sistemas tricompartimentales, esto fue refutado en parte por el análisis de Skinner y cols (1959) dando fórmulas explícitas para estos sistemas. En un sentido complementario, Hearon (1969) ha estudiado las condiciones suficientes para que un compartimento cualquiera de un sistema n - compartimental puede ser descrito por solo dos términos exponenciales.

Por último, existe otro método que han de emplearse con cuidado porque tiende a sobreestimar el volumen de distribución (Riggs, 1970). Consideremos el sistema de la figura 7 en el que la única ruta de salida es del compartimento 1 al exterior. Supongamos primero que $K_{1,E}$ es cero; entonces el sistema sería simplemente un sistema bicompartimental cerrado y podríamos aplicar las fórmulas ya descritas.

Si $K_{1,E}$ la suponemos ahora mayor que cero pero mucho menor que $K_{1,2}$ y $K_{2,1}$, la aproximación de 1 y 2 al equilibrio estará poco influenciada por la tasa de eliminación del trazador al exterior y por lo tanto, después de suficiente tiempo, cuando el primer término exponencial sea negligible, 1 y 2 se comportarán prácticamente como un solo compartimento con un volumen de distribución igual a V_{1+2} . Según las

ecuaciones 24, y 25. de Riggs , la concentración en ese compartimento sería (Riggs, 1970; Loo y Riegelman, 1970):

$$C_{1+2}(t) = (R / V_1) \left[\left(\frac{Z + K_2 - K_1}{2Z} \right) \exp \left[-1/2(K_1 - K_2 - Z)t \right] \right] \quad (27.)$$

a $t = 0$

$$C_{1+2}(0) = (R / V_1) \left(\frac{Z + K_2 - K_1}{2Z} \right) \quad (28.)$$

Concentración que puede ser calculada representando las concentraciones observadas en papel semilogarítmico y extrapolando la recta que representa la segunda exponencial a tiempo cero.

Entonces el volumen de distribución sería

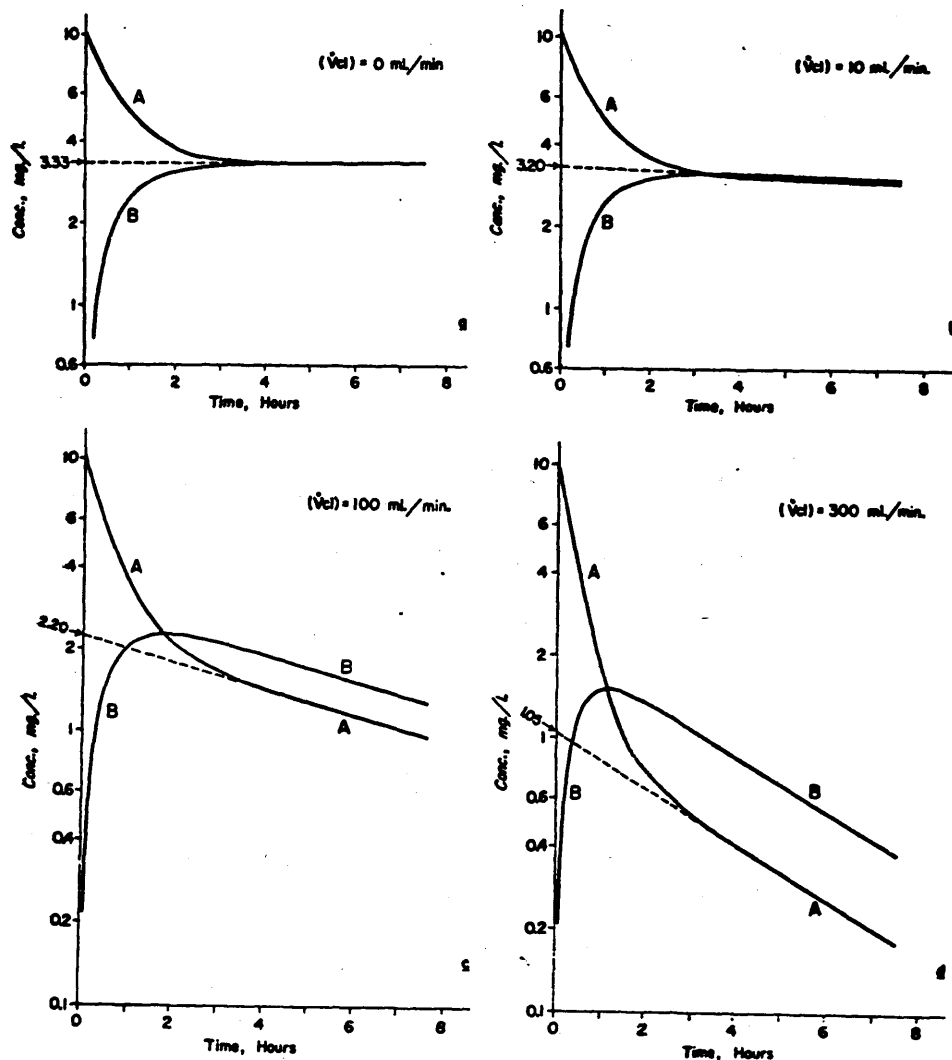
$$V_{1+2} = V_{\text{dist.int.}} = R / C_{1+2}(0) \quad (29.)$$

Donde V. Dist. int. representa el volumen de distribución estimado a partir de la intersección con el tiempo cero.

La figura 11 tomada de Riggs (1970) muestra las estimaciones erróneas de $C_{1-2}(0)$, y por lo tanto del Volumen de Distribución, a que puede conducir este método, en relación con el aclaramiento del trazador.

FIGURA 11

EFFECTO DEL ACLARAMIENTO, EN UN SISTEMA COMPARTIMENTAL ABIERTO,
SOBRE LA ESTIMACION DEL VOLUMEN DE DISTRIBUCION



Al aumentar el Aclaramiento, la extrapolación a tiempo cero de la concentración del trazador en el compartimento A, conducirá a mayor error al usarla para calcular el Volumen de Distribución.

(Tomado de Riggs, 1970)

3.3. Aplicación de los Computadores Electrónicos: Analógicos y Digitales

Hemos visto que la complejidad de los cálculos necesarios para calcular los constantes de transferencia y volúmenes de distribución en sistemas tri- y multicompartimentales hacía necesario (Berman y cols, 1961) la utilización de computadores digitales para su resolución.

Si además consideramos las direcciones en que ha ido evolucionando el análisis compartimental, hacía el estudio de modelos que no se encuentran en estado de equilibrio (Hart, 1957; Whipple, 1963) o no en equilibrio (Lax y Wrenshall, 1953; Berger y Stells, 1958), hacia la aplicación de modelos estocásticos al estudio del comportamiento de trazadores (Sheppard, 1962; Sheppard y Uffer, 1969; Sheppard, 1971), etc., y la complejidad de cálculo que estos estudios representan, podremos comprender por que los computadores electrónicos se han convertido en instrumentos de trabajo imprescindibles en el análisis compartimental (Abrams, 1969).

Computadores Analógicos

Se basan en un sistema en el que los componentes electrónicos están dispuestos para dar una analogía directa con el sistema biológico bajo estudio.

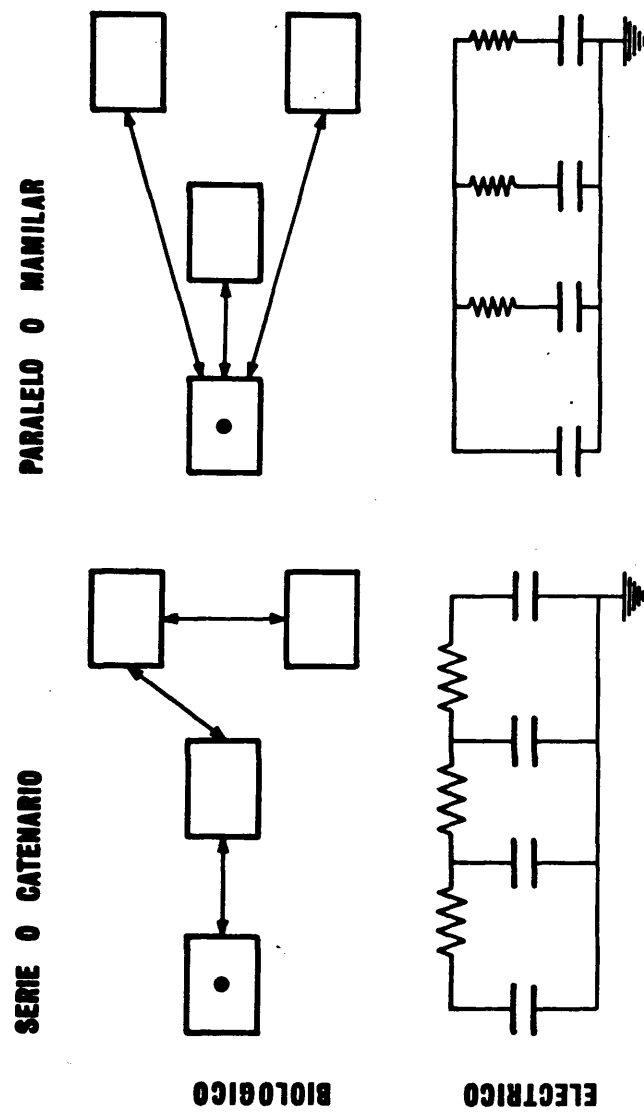
Su fundamento básico es el hecho de que las ecuaciones que describen la actividad específica de un trazador en ciertos sistemas compartimentales son idénticas en su forma a aquellas que describen el voltaje en circuitos de resistencias y condensadores (RC) (Robertson, 1962).

La figura 12 muestra los análogos RC de un sistema de 4 compartimentos catenarios y un sistema de 4 compartimentos mamilar. Los valores de las resistencias serán inversamente proporcionales a las tasas de flujo, siendo la capacidad de los condensadores análoga al tamaño del compartimento, y el voltaje, a la actividad específica (Toates, 1970). Para que los análogos RC puros sean válidos es esencial que las tasas de transferencia entre dos compartimentos sean iguales en ambas direcciones (Paynter, 1955). En las figuras 13 y 14 representamos algunos de los sistemas compartimentales básicos que son analizables con circuitos análogos RC; resueltos con un circuito desarrollado por Sugarman y Potter, (1961). En todos los casos el trazador está presente inicialmente en el compartimento marcado con un asterisco.

Otra manera de usar los computadores analógicos, (MacDonald y cols., 1957; Robertson 1961, 1962) consiste en que los componentes electrónicos se disponen para resolver las ecuaciones diferenciales que rigen el comportamiento del trazador en el sistema.

FIGURA 12

ANALOGOS ELECTRICOS DE SISTEMAS COMPARTIMENTALES BIOLOGICOS



(Tomado de Robertson, 1962)

FIGURA 13

SOLUCION DE VARIOS SISTEMAS COMPARTIMENTALES CON UN COMPUTADOR ANALOGICO

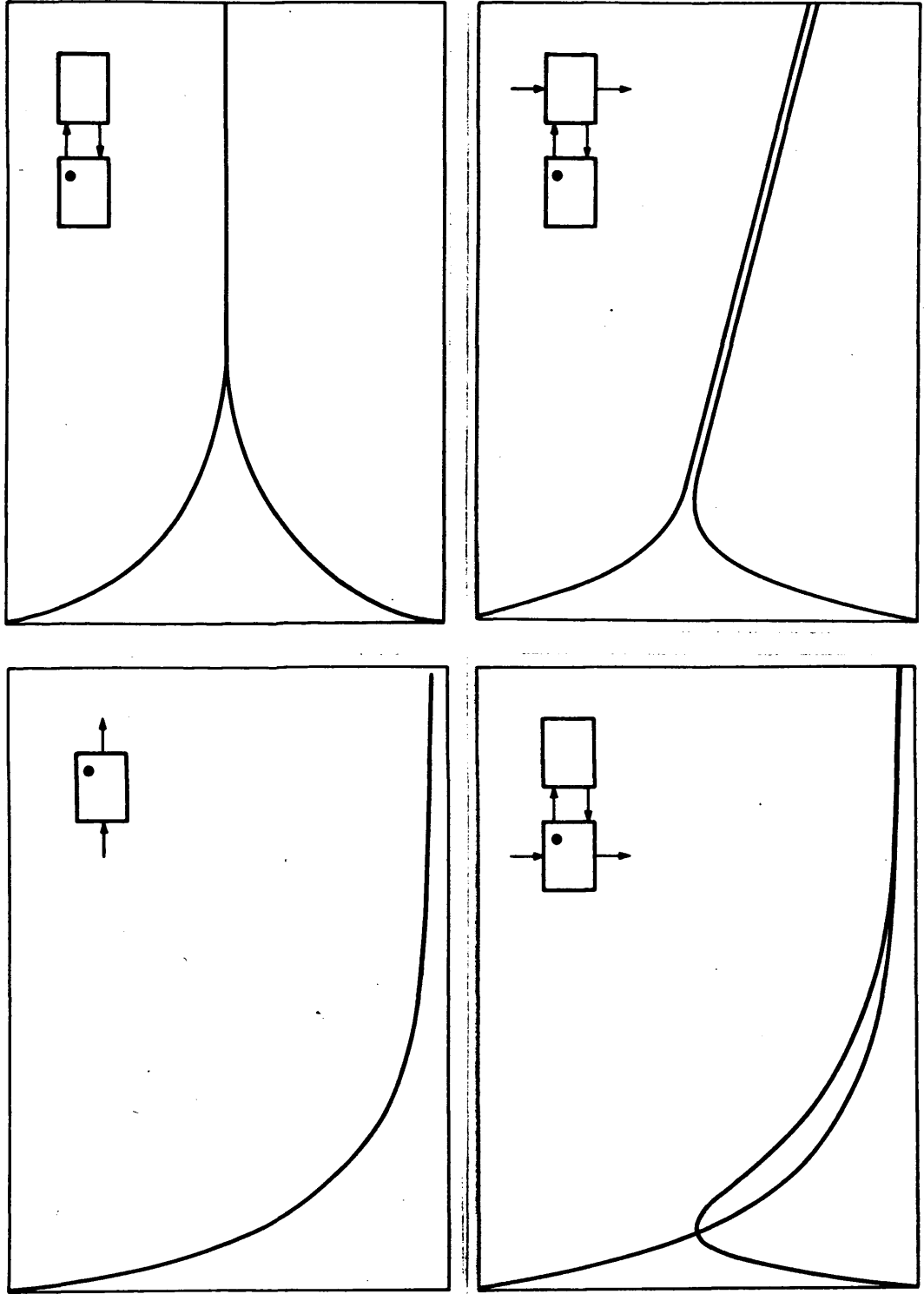
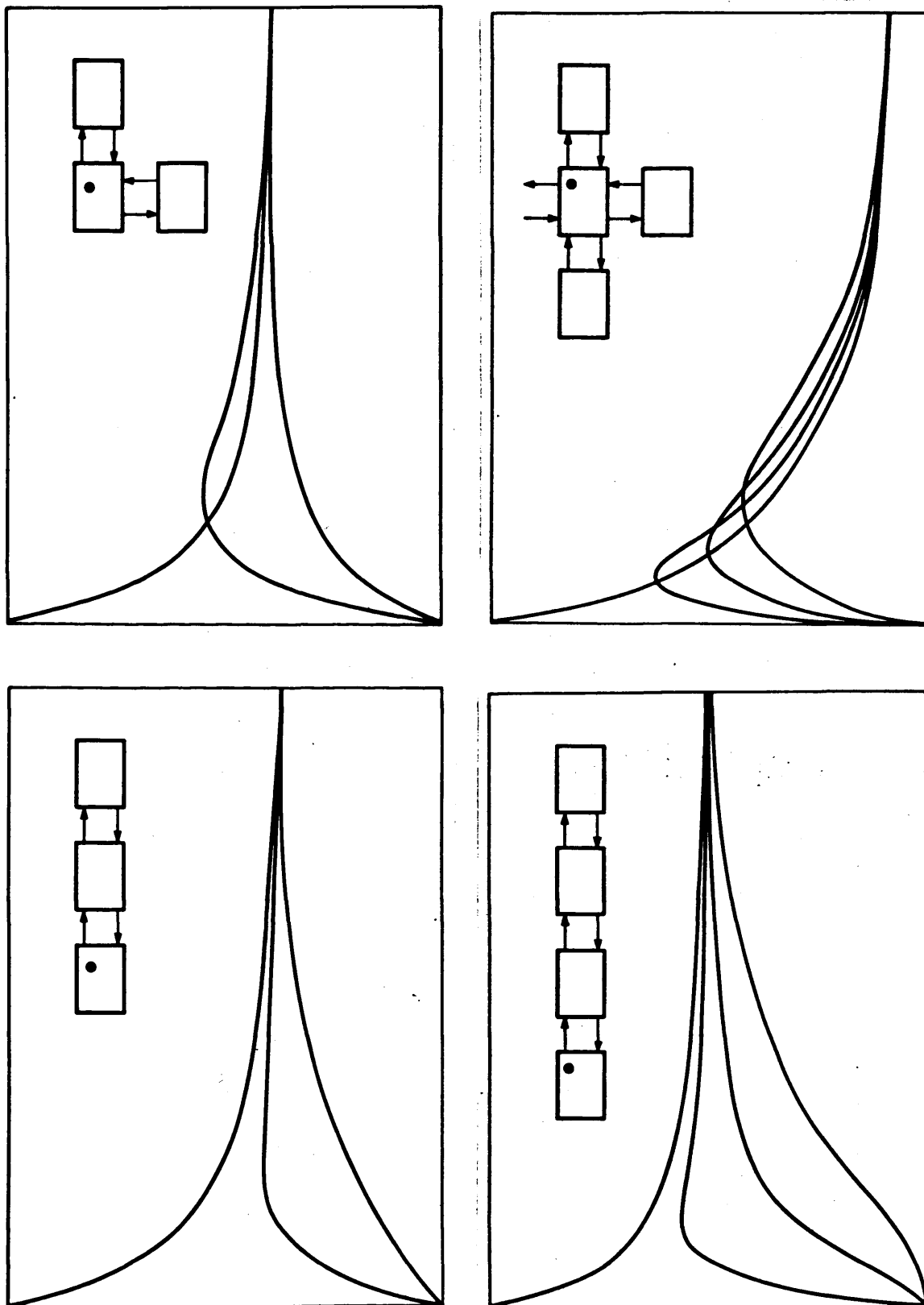


FIGURA 14

SOLUCION DE VARIOS SISTEMAS COMPARTIMENTALES CON UN COMPUTADOR ANALOGICO



Este tipo de métodos tienen como elemento básico en sus circuitos el amplificador operacional, discutido por Stacy (1960) que puede ser usado para sumar, restar, multiplicar, dividir, diferenciar e integrar.

También, mediante el uso de amplificadores, MacDonald y cols. (1957) han desarrollado un circuito para la simulación de flujos de transferencias desiguales entre dos compartimentos que es solo una modificación del computador RC básico.

Gregg (1959) ha utilizado y discutido un computador analógico indirecto para estudiar el aclaramiento renal de Diodrast; Solomon y Gold (1955) para el estudio de la distribución corporal del Potasio; Rollinson y Rotblat (1955) para el metabolismo del yodo; Loo y Reigelman (1970) para el cálculo de constantes farmacodinámicas; y Fish (1959) ha discutido las aplicaciones de los modelos analógicos al problema general del análisis compartimental.

Computadores Digitales

Los computadores analógicos son útiles para determinar rápidamente cuál de varios tipos posibles de sistemas proporciona la mejor explicación para un grupo de datos experimentales; pero una vez que se ha encontrado el tipo de sistema idóneo, los computadores digitales proporcionan mayor

precisión que los analógicos, o en caso de existir ambigüedades debidas a datos incompletos, ayudan a establecer el rango de los valores posibles (Abrams, 1969).

Uno de los posibles usos es como ya vimos, el ajuste de curvas multiexponenciales a los datos observados cuando, de bido a los errores acumulativos aleatorios en los datos, o a no linealidad del sistema, el método de mínimos cuadros no proporciona resultados satisfactorios (Cornell, 1962, Gardner y cols, 1959; Sekel y cols, 1966, Melbin, 1967; Parsons, 1970; Patel, 1970; Pedraza, 1972). Una serie de subrutinas útiles para ello se encuentran en los programas BMD, series X, (Dixon, 1970).

Otra aplicación consiste en la labor de cálculo necesaria para transformar los parámetros de las ecuaciones multiexponenciales de los datos, a los parámetros estáticos y dinámicos del sistema (Stacy, 1960).

Sheppard (1962) ha presentado un programa para resolver problemas de tres compartimentos no en estado de equilibrio escrito en FORTRANSIT, una modificación del FORTRAN, para un IBM-650.

Berman y cols, (1961) desarrollaron un programa muy general, adecuado para sistemas lineales, aunque no está restringido a ellos, y que puede manejar hasta 40 parámetros, de

los cuales 25 pueden ser desconocidos en un sistema de hasta 15 compartimentos; escrito en FORTRAN para un IBM-704.

Se han desarrollado posteriormente otra serie de programas para análisis compartimental (Blessner, 1969) siendo dos de los más recientes, el MINICOSMO, (Kindley, 1970), descrito como un generador universal de modelos compartimentales en estado de equilibrio, y un modelo de Dickinson (1971) para estudio de las interacciones riñón-circulación y los compartimentos de líquidos corporales.

Evert y Randall (1970) han discutido la conveniencia de la tendencia a que casi cada laboratorio desarrolle su propia librería de programas de modelos compartimentales, recordando la existencia de programas de aplicación general como el programa de IBM "System 360.- Continuous System Modeling Program, H20-0367-2" que puede resolver una gran mayoría de los modelos en uso a través del empleo de algoritmos (Zadeh y Desoer, 1963) que suministran soluciones analíticas sin que sea requerido el usuario a manipular matrices o usar transformadas de Laplace.

CAPITULO TERCERO.-

FUNDAMENTOS DE ESPECTROMETRIA DE CENTELLEO LIQUIDO

El problema metodológico fundamental planteado por los estudios de dilución isotópica es el de la determinación de la concentración del trazador en las muestras, o alícuotas del volumen de distribución, recogidas. (Catch, 1956)

Por esta razón, para la determinación del volumen de agua corporal total vino usándose durante varios años el óxido de deuterio con preferencia al óxido de tritio, hasta que se dispuso de un instrumento de medida de alta eficiencia para la determinación de la actividad absoluta de los beta-emisores de baja energía, es decir, hasta la aparición del Contador de Centelleo Líquido. (Kallman, 1951; Snell, 1962; I.A.E.A., 1965; Tothill, 1966; Hine, 1967).

Por la importancia que pueden tener en la interpretación de nuestros resultados algunas de las características o operativas de este tipo de instrumentos y especialmente las técnicas de preparación de muestras, según discutiremos más adelante, y para una mejor evaluación de las aportaciones metodológicas que hemos podido desarrollar en el curso de esta Tesis Doctoral, creemos justificado hacer ahora una revisión de los fundamentos básicos de la Espectrometría de Centelleo Líquido, obligadamente breve, aunque puede encontrarse información extensa sobre el tema en la bibliografía que incluimos. (Bell y Hayes, 1958; Van der Does, 1959; Owen, 1960; Birks, 1964; Rapkin, 1964; Parmentier y Ten Haaf, 1969; Gibson y Lally, 1971)

1. PRINCIPIOS OPERATIVOS

Los radionúclidos o radioisótopos sufren un proceso de desintegración espontánea de sus átomos emitiendo una radiación que puede ser, basicamente, alfa, beta o gamma. La actividad de un radionúclido o radioisótopo se mide por el número de desintegraciones radioactivas que sufre por unidad de tiempo, siendo las unidades corrientemente empleadas el Curio = $3,7 \times 10^{10}$ Desintegraciones por segundo, y sus submúltiplos, el miliCurio, el microCurio y el nanoCurio, aunque, por las características de la instrumentación, se suele hablar corrientemente de Desintegraciones por Minuto (dpm), siendo $1 \text{ Curio} = 2,2 \times 10^{12} \text{ Dpm}$.

La radiación beta consiste en electrones de alta energía procedentes del núcleo de los átomos que se desintegran. La mayor parte de las partículas beta están cargadas negativamente, pero algunas, particularmente las que proceden de isótopos relativamente deficientes en neutrones, pueden estar cargadas positivamente, llamándose entonces positrones. (Mann y Garfinkel, 1966; Radiochem. Ctr., 1966).

El poder de penetración de esta radiación es bajo; una partícula beta de alta energía emitida por el Fósforo-32, con una energía máxima de emisión de 1,7 MeV, tiene un alcance en agua de 7 mm. Si consideramos un emisor beta de baja energía como el tritio, con una energía máxima de emi-

sión de 0,018 MeV, este alcance se va reducido a solo 0,007 mm. (Slack y Way, 1959)

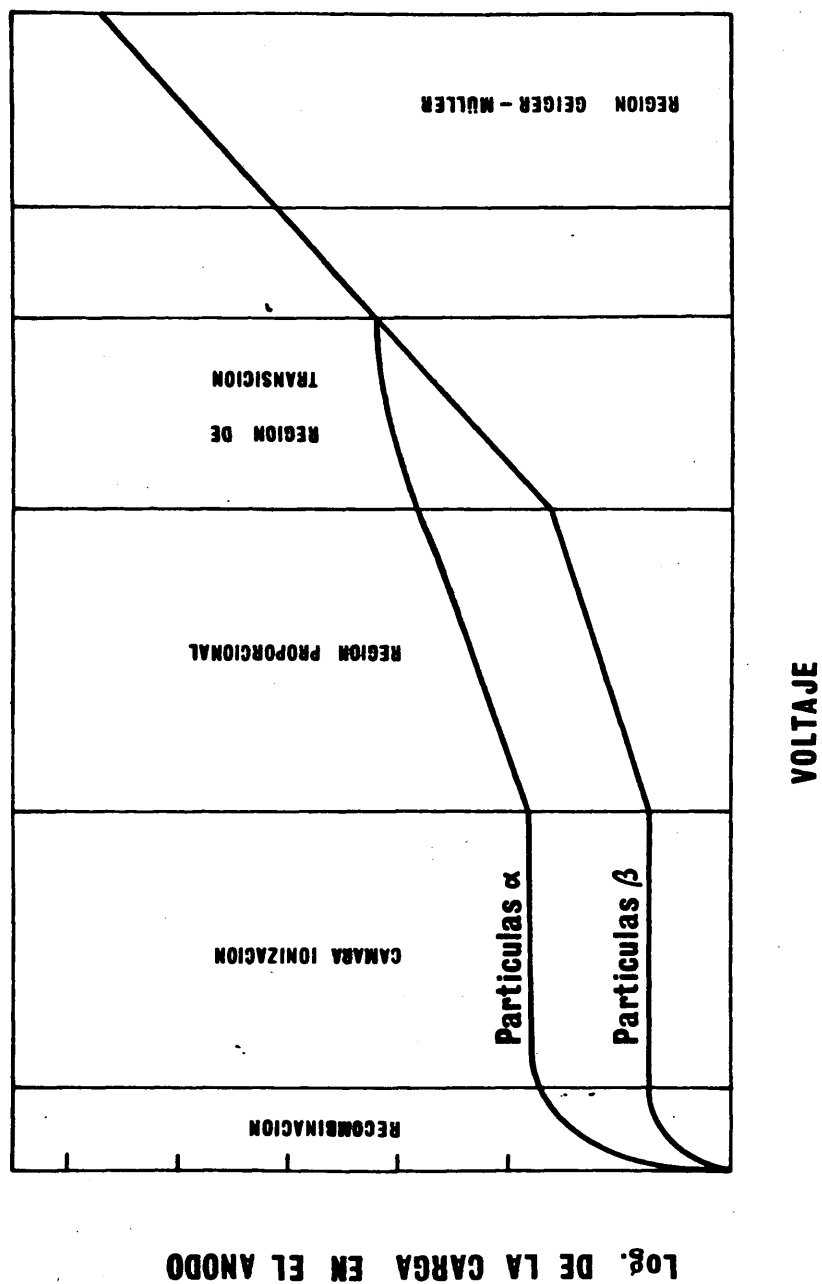
Para la detección y medida de estas radiaciones se usan algunos de los efectos de su interacción con la materia. Vamos a limitarnos aquí a la medición de la radiación beta, aunque, para un estudio mas general, pueden consultarse las referencias siguientes: Washtell, (1958). Gray y Loose more, (1959), O'Kelley, (1962), Sharpe, (1962), y Taylor (1967).

Para la radiación beta se usó en un principio el efecto de Ionización o el Tubo Geiger-Müller, basados (Wilkinson, 1950) en que al aplicar un voltaje entre dos electrodos colocados en el gas, los iones formados al paso de la radiación beta se moverán hacia los electrodos y constituirán una corriente eléctrica. Esta corriente puede medirse y dará una indicación de la ionización desarrollada y por lo tanto del paso de la radiación a través del gas.

Si el voltaje es suficientemente alto y uno de los electrodos es conformado para dar un campo eléctrico de alta intensidad, los iones formados adquirirán suficiente energía para ionizar otros átomos del gas al chocar con ellos, dando lugar a un proceso de multiplicación resultante en un pulso eléctrico que puede registrarse en un circuito acumulador o "scaler" dando lugar a una "cuenta" equivalente

FIGURA 15

RELACION ENTRE EL VOLTAJE APLICADO Y LA CARGA
EN EL ANODO DE UN CONTADOR TIPO GEIGER-MÜLLER



a la desintegración que ha sufrido uno de los átomos del radioisótopo.

Si el proceso de multiplicación es limitado, el tamaño del pulso será proporcional a la energía de la radiación absorbida y tendremos un contador gaseoso proporcional; pero si se aumenta más el voltaje, el proceso de multiplicación alcanza la saturación, siendo entonces independiente el tamaño del pulso eléctrico de la energía de la radiación incidente, denominándose al instrumento que trabaja en estas condiciones, contador Geiger-Müller. (Nokes, 1958). (Fig. 15)

El principal problema encontrado al emplear este tipo de instrumentos para la medición de la radiación beta, (Gray, 1952) fué el de las bajas eficiencias de contaje obtenidas. (La eficiencia de contaje se define como la relación entre las cuentas acumuladas por el instrumento en un intervalo de tiempo y el número de desintegración que han tenido lugar en la muestra radioactiva durante ese intervalo).

En cualquier método de detección de radiación, la eficiencia de contaje es máxima cuando el máximo número de partículas emitidas alcanza el detector e interacciona con él en la forma deseada.

Las pérdidas en eficiencia tienen lugar cuando las partículas beta escapan en otras direcciones lejos del detector

o son detenidas en él por algún mecanismo que no resulta en una cuenta. También, al ser bajo el poder de penetración de las partículas beta, cuando son detenidas durante su recorrido a través de la propia muestra radioactiva. Estos dos fenómenos se denominan Absorción entre la muestra y el detector y Absorción en la muestra o Autoabsorción.

Para obviar esta dificultad se utilizaron muestras de muy pequeño espesor e instrumentos con ventanas muy finas y geometría de contaje 4π o técnicas similares a la de PACE y KLINE (1947), de gasificar la muestra y mezclarla con el gas de llenado del contador Geiger-Müller, técnicas que adolecían las primeras de coste excesivo y las segundas de excesiva complicación, mala reproducibilidad y baja sensibilidad.

En el contador de centelleo líquido la muestra radioactiva está disuelta, suspendida, o inmersa, en una solución de compuestos fluorescentes o "fluors" que actúan como detectores. Esta mezcla íntima de la muestra y el detector evita de una parte la autoabsorción de las partículas beta y de otra parte hace prácticamente nula la absorción entre la muestra y el detector porque los átomos radioactivos están rodeados por las moléculas del detector obteniéndose una geometría de contaje 4π y además, el espesor de la solución de "fluors" necesario para parar todas las partículas beta ("espesor infinito") es pequeño, pudien_

do evadir la detección solo las partículas beta emitidas en la capa de líquido en contacto con la superficie interna del vial en que está contenida la mezcla muestra-solución detectora. Siendo los viales cilíndricos, la relación volumen superficie es lo bastante alta para hacer mínimas las pérdidas en eficiencia por este concepto. Un excelente estudio comparativo de las ventajas del Contador de Centelleo Líquido sobre la Cámara de Ionización para la medida de la radiación beta ha sido realizado por Guinn y Wagner (1960).

La solución detectora, o mezcla de centelleo como se denomina usualmente, convierte en luz la energía de la partícula beta emitida por la muestra radioactiva; esta luz es detectada por un tubo fotomultiplicador que produce un pulso eléctrico que puede ser amplificado y utilizado para activar un circuito contador. (Birks, 1964).

La mezcla de centelleo está compuesta por un sistema solvente, compuesto de uno o varios solventes denominados primario o secundario de acuerdo a su abundancia relativa, y de generalmente dos solutos centelleadores, denominados primario o secundario de acuerdo con su función en el proceso de transformación de la energía de la partícula beta en luz, que puede resumirse como sigue.

1 - La energía de la partícula es transferida al sol_

vente (solo en una pequeñísima parte directamente al soluto) como energía de ionización o principalmente de excitación electrónica de su molécula. (Kallman y Furst, 1958; Swank, 1954). La mayor parte de esta energía se degrada a calor o se consume en cambios químicos pero un 5% es transferida al soluto primario. Este proceso ocurre en unos 10^{-9} segundos. (Kallman y Furst, 1958).

2.- Las moléculas del soluto fluorescente primario excitadas por la energía transferidas retornan a su estado original emitiendo cuantos de luz en la región visible o casi ultravioleta. (Furst y Kallman, 1952).

3.- El soluto primario cuando está presente absorbe esta luz y la reemite a una mayor longitud de onda para conseguir un mejor acoplamiento entre el espectro de emisión de la mezcla de centelleo y la respuesta espectral del tubo fotomultiplicador. (Swank, 1954).

Los cuantos de luz que llegan al tubo fotomultiplicador provocan la emisión de electrones de una capa fotosensitiva en la cara interna del tubo o fotocátodo. Estos electrones son acelerados a través de una serie de 10 o 14 dinodos liberando electrones secundarios en cada uno de ellos y la corriente final en el ánodo es convertida en un pulso de voltaje que puede ser contado en un circuito acumulador.

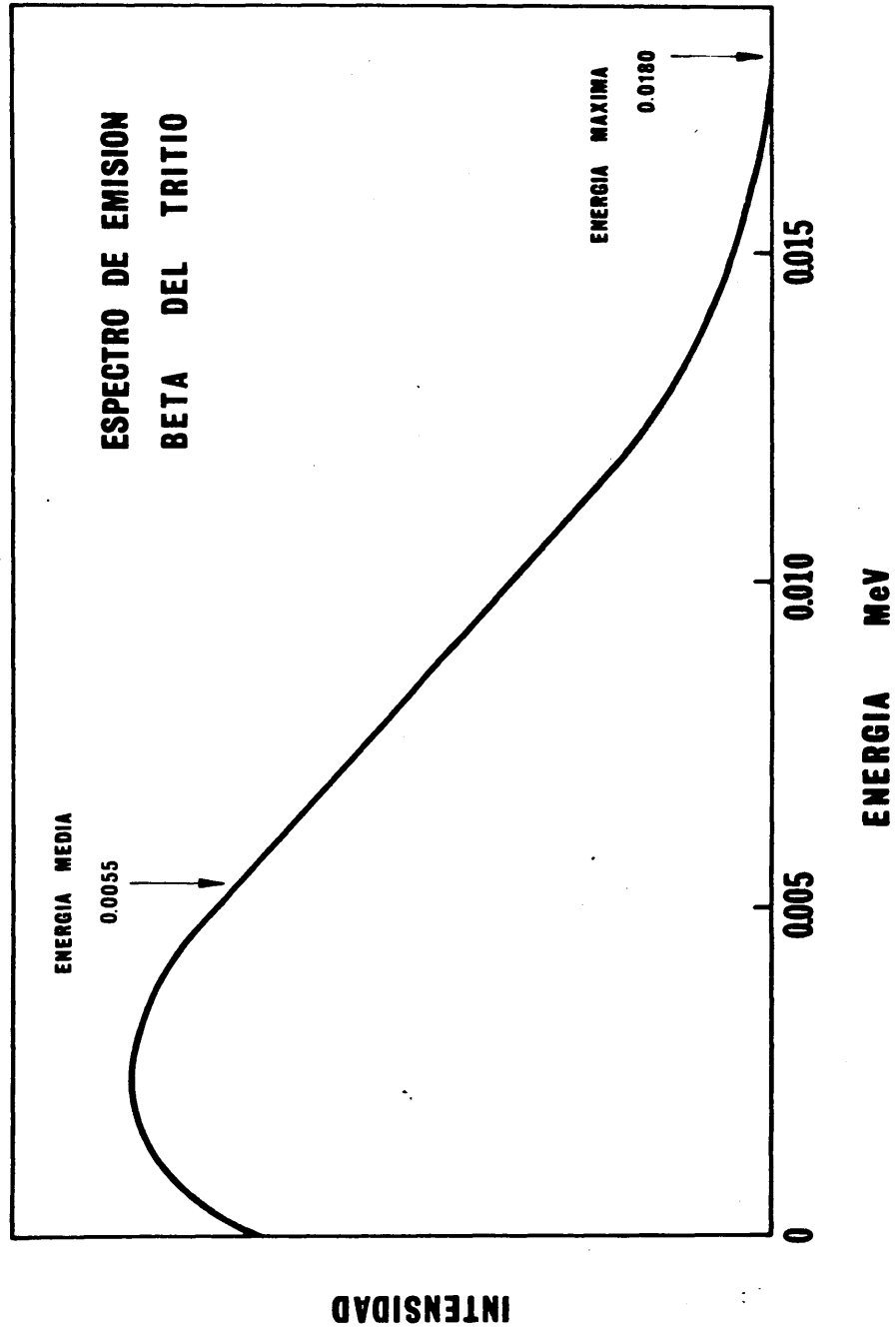
Quizá la más importante característica del Contador de Centelleo Líquido está en que es un contador proporcional. (Davidson y Feigelson, 1957) Esto es, si una partícula es detenida completamente en la mezcla de centelleo, con condición que se cumple perfectamente para las betas de poca energía, el tamaño del pulso de voltaje producido por el fotomultiplicador será proporcional a la energía de la partícula.

En la figura 16 representamos el espectro de emisión del tritio.

Los pulsos producidos por el fotomultiplicador son amplificados y enviados a un analizador de altura de pulsos que compara la señal con unos voltajes de referencia. (Fig 17). A continuación, un circuito discriminador deja pasar la señal al circuito contador si está dentro de un "canal" entre dos límites de voltaje seleccionados. Los límites superior e inferior del discriminador pueden ser fijados a voluntad.

Una modalidad de conteo consiste en fijar el límite inferior a un valor dado y el superior a infinito, con lo cual el discriminador dejará pasar todos los pulsos que superen el límite inferior, esto es conocido como "conteo integral".

FIGURA 16



(Slack y Way, 1959)

FIGURA 17

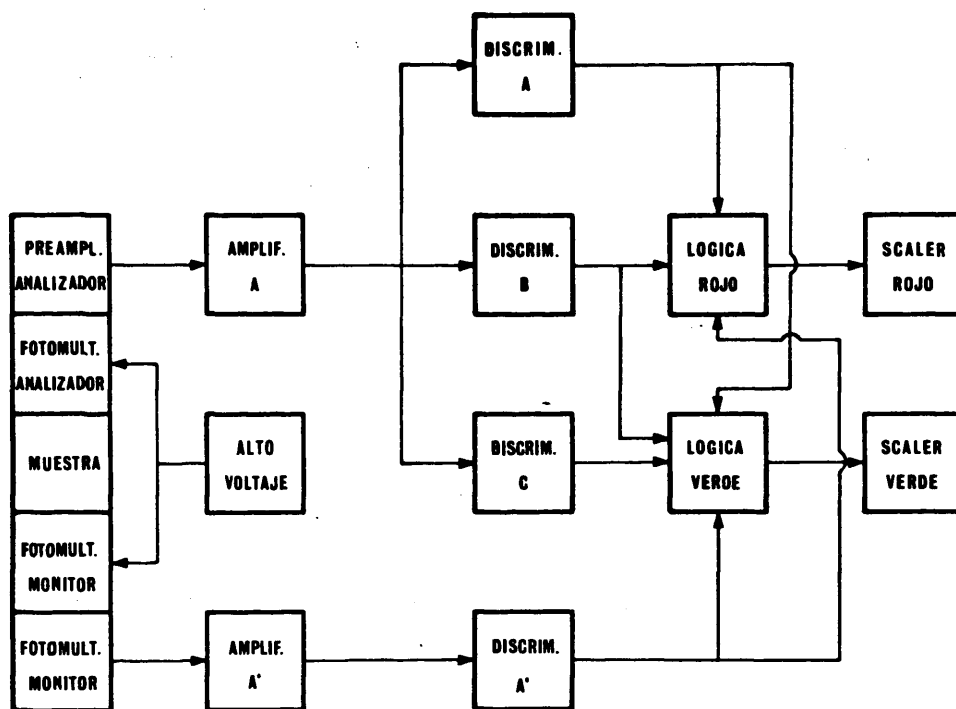


DIAGRAMA DE BLOQUES DEL CONTADOR TRI-CARB 314 AX [PACKARD]

[TRI-CARB 314-AX. OPERATION MANUAL. PACKARD INSTR. CO. INC., ILLINOIS, U. S. A.]

Cuando se cuenta en la "ventana" entre dos límites finitos del discriminador se habla de "contaje diferencial".

Un contador de centelleo moderno puede tener 6 discriminadores variables y contar simultaneamente en tres o más canales. Las ventajas ofrecidas por este sistema de análisis de la altura de los pulsos son (Davidson y Feigelson, 1957):

1.- Posibilidad de discriminar las señales producidas por la Muestra y las debidas a la Radioactividad de Fondo, eligiendo los canales de forma que incluyan la región del espectro en que se optimice la relación Muestra/Fondo.

2.- Posibilidad de contar simultaneamente dos o tres isótopos, (siempre que sus energías medias de emisión sean diferentes al menos por un factor de 5), eligiendo apropiadamente dos o tres canales de contaje. (Bush, 1964; Okita y cols, 1957).

3.- Posibilidad de determinar el "Apagamiento" y la Eficiencia con que se ha contado la muestra, por cualquiera de los métodos que más adelante comentaremos.

2. RADIOACTIVIDAD DE FONDO

Por este término, al que acabamos de referirnos, entiende

mos las cuentas por unidad de tiempo que son registradas por el contador de centelleo líquido cuando contamos una muestra "en blanco", es decir que no contiene radioactividad pero tiene la misma composición química que la muestra conteniendo radioactividad. (Vander Does, 1959)

Las cuentas debidas a la "radioactividad de fondo" ("Fondo" abreviadamente) deben sustraerse de las cuentas observadas para una muestra conteniendo radioactividad, para obtener las cuentas reales de esta.

Las cuentas de la radioactividad de fondo son debidas principalmente a los siguientes factores:

2.1. Radioisótopos naturales en los materiales usados para el conteo, en los viales en la muestra

Todos los materiales usados se escogen cuidadosamente en orden a que tengan la mínima actividad. El tipo de vial usado más ampliamente está hecho de un vidrio especial boro silicatado, conteniendo una cantidad mínima de potasio, ya que en este se encuentra el radioisótopo natural beta- y gamma-emisor Potasio-40 en una proporción de 0,01%. (Davidson y Feigelson, 1957).

Sin embargo aun para este vidrio especial la Radioactividad de Fondo es más elevada que para los viales de cuarzo,

polietileno o nylon, aunque estos últimos presentan algunos otros problemas (Rapkin y Gibbs, 1963) que discutiremos en su momento. También puede contribuir a la Radioactividad de Fondo el Carbono 14 que se encuentra en los compuestos orgánicos contemporáneos con actividad específica de unas 15 dpm por gramo. Afortunadamente la mayor parte de los solventes orgánicos se pueden obtener de los hidrocarburos "fríos" del petróleo.

La mejor forma de eliminar la Radioactividad de fondo que originan estos radioisótopos naturales, es estrechar la "ventana de conteo" dentro del espectro del isótopo que estamos midiendo.

2.2. Radiación Cósmica

Esta Radiación reacciona con la materia produciendo mesones de alta energía, radiación beta, gamma y X, que bombardean al contador desde todas las direcciones. Además de excitar la mezcla de centelleo por el proceso que ya conocemos, pueden producir luz visible por efecto Cerenkov. Esta radioactividad de fondo se encuentra en el extremo de alta energía del espectro y puede minimizarse rodeando la cámara de conteo con un "escudo" de un material de alta densidad (usualmente una aleación de plomo y tungsteno).

2.3. Fosforescencia

En el uso más general de este término, se denomina así a

la propiedad de ciertos compuestos de emitir luz después de ser excitados. Se distingue de la fluorescencia en que la vida media (Tiempo en que la luz emitida se reduce a un 69,3% de la original) de esta última generalmente es del orden de 10^{-9} a 10^{-7} segundos mientras que la de la fluorescencia puede durar horas. (Pringsheim, 1949).

El vidrio de los viales o de la ventana del tubo fotomultiplicador puede ser excitado por ciertas frecuencias del espectro ultravioleta presentes en la luz diurna o en la luz fluorescente. (Davidson y Feigelson, 1957; Agranoff, 1957). También pueden existir sustancias fosforescentes en la propia muestra; algunas muestras biológicas, la orina por ejemplo tienen esta característica. Aunque la fosforescencia en estos casos suele ser de baja intensidad, la luz emitida puede en algunos casos interferir seriamente, especialmente en el conteo de muestras de baja actividad.

Así pues, un paso casi obligado en la preparación de muestras es tratar de evitar en lo posible la luz diurna directa o la fluorescente y someter las muestras a un periodo de adaptación a la oscuridad para eliminar en lo posible las cuentas debidas a la fosforescencia.

Además, los fotones producidos por este concepto son emitidos aisladamente y distribuidos al azar en el tiempo, a diferencia de las "descargas" de fotones ocasionados por las

excitaciones múltiples que una desintegración radioactiva en la mezcla de centelleo; así, los pulsos eléctricos que originen serán de muy poca intensidad y muchas veces proviniendo de solo uno de los tubos fotomultiplicadores. Por ello, fijando el límite inferior de los discriminadores por encima del voltaje que estos pulsos pueden alcanzar, y usando un circuito de coincidencia, conseguiremos reducir aún más la Radioactividad de Fondo debida a la fosforescencia. (Davidson y Feigelson, 1957).

2.4. Ruido Térmico de los Tubos Fotomultiplicadores

La energía requerida para liberar un electrón del cátodo del tubo fotomultiplicador es pequeña; no solo la luz visible, sino la energía calorífica, pueden causar emisión de electrones. Este último tipo se llama "emisión termoiónica" y puede resultar en pulsos eléctricos que contribuirán a la Radioactividad de Fondo. (Swank, 1958).

Este fenómeno ocurre al azar en el tiempo y limitado a uno solo de los tubos. La probabilidad de que ambos tubos produzcan un pulso eléctrico debido a la emisión termoiónica simultáneamente es pequeñísima, (Rapkin, 1968), así con el uso de un circuito de coincidencia, que solo dejará pasar a los "scalers" los pulsos que provengan simultáneamente de ambos tubos fotomultiplicadores, se reduce considerablemente la interferencia del ruido térmico.

Aún así, la mayor parte de la radioactividad de fondo procedía de este factor en los primeros modelos de contadores con fototubos S11 de Cesio y Antimonio, (Sharpe y Stanley, 1962) constituyendo una seria desventaja en las determinaciones de bajos niveles de actividad. Para resolver esto, se recurrió a mantener los fototubos y la cámara de contaje en una cámara refrigerada, lo que bajaba el ruido térmico a niveles aceptables pero dificultaba la manipulación de muestras de alto contenido acuoso y mezcla basada en dioxano.

Otra alternativa la constituyeron los tubos "S", que permitian contar a temperatura ambiente, aunque la eficiencia obtenida era bastante baja. Pero afortunadamente, con la introducción de los fototubos "bialcali", usados en la mayor parte de los nuevos modelos, que llevan potasio junto al cesio y antimonio, constituyendo la capa fotosensitiva del cátodo, este problema se ha visto resuelto, (Sharpe y Thomson, 1958), obteniéndose altas eficiencias de contaje a temperatura ambiente con una baja Radioactividad de Fondo; siendo necesario ahora controlar la temperatura en atención solo a la reproducibilidad de las condiciones de contaje.(Rapkin, 1968)

3. EFICIENCIA DE CONTAJE

La eficiencia de conteo la hemos definido como la relación entre las cuentas netas (cuentas observadas menos cuentas de Radioactividad de Fondo) observadas por el instrumento en un intervalo de tiempo, y las desintegraciones reales ocurridas en las muestras en el mismo intervalo. La eficiencia dependerá de todas las variables que afectan la altura de los pulsos; algunas de estas variables serán dependientes del sistema, y algunos obedecerán las leyes de las fluctuaciones al azar, pudiendo resumirse las más importantes en:

3.1. Fracción de la Energía de la Partícula absorbida por la Mezcla de Centelleo

Depende de la relación volumen / superficie de la muestra, que es alta en el caso de los viales cilíndricos de 20 ml. corrientemente usados, en los que, por tanto, el volumen de muestra es suficientemente grande en relación al alcance de la radiación beta.

3.2. Eficiencia de Conversión de la Mezcla de Centelleo

En una buena mezcla, aproximadamente un 5% de la energía de una partícula beta es convertida en luz. (Hayes, 1956; Kallman y Furst, 1958). Depende esta conversión de las

características de los solventes y solutos primarios y secundarios usados que discutiremos mas adelante

3.3. Acoplamiento Espectral entre la Mezcla de Centelleo y los Fototubos

Generalmente se resuelve utilizando dos solutos como veremos después. (Ott, 1958).

3.4. Temperatura de la Muestra

Se ha observado que aparece un pequeño incremento en el número de cuentas por unidad de tiempo al disminuir la temperatura. (Rapkin, 1968; Swank, 1954). Este factor no es muy importante y sus causas no se conocen, aunque pueden ser cambios en los mecanismos de transferencia de energía, desplazamientos espectrales, etc.

3.5. Volumen de la Muestra

A veces el número de cuentas por unidad de tiempo es dependiente del volumen de la muestra, aún manteniendo esta una actividad constante; ello puede ser debido a dos factores: efectos ópticos o autoapagamiento, que discutiremos más abajo.

3.6. Eficiencia de Captación de la luz emitida

Si no hubiese pérdidas de luz en el sistema, cada foton emitido encontraría su camino a uno de los dos fototubos en un sistema de coincidencia y produciría un pulso. Pero la luz puede no llegar a alcanzar el fototubo cuando sufre múltiples reflexiones en la cámara de contaje, produciendo se el fenómeno que se denomina de "atrapamiento". (Swank, 1958). La luz que golpea la pared interna del vial a un ángulo mayor que uno crítico será reflejada totalmente y puede no llegar a salir. O, si lo hace, puede ser atrapada en la cámara de contaje por reflexiones múltiples en las paredes o en las ventanas de vidrio de los fototubos. Solo los fotones que inciden en las caras de los fototubos a un ángulo menor que el crítico pueden ser contados.

El atrapamiento de la luz puede reducirse por el uso de paredes de reflexión difusa en la cámara de contaje, con alta reflectividad en la región del espectro que nos interesa. (Swank, 1958).

3.7. Eficiencia de conversión del Cátodo del Tubo Fotomultiplicador

Dependerá de varios factores: La longitud de onda de la luz incidente, el grosor y la composición de la capa sensitiva, la temperatura, etc. Para longitudes de onda de apro

ximadamente 4.200 \AA la eficiencia de emisión del fotocátodo es de 15 a 25% (Swank, 1958).

3.8. Factores de Amplificación

La primera amplificación de la corriente tiene lugar en el tubo fotomultiplicador. Se pueden obtener factores de amplificación de 10^4 a 10^6 dependiendo del alto voltaje aplicado. Lógicamente, interesa tener un factor de amplificación alto para una buena discriminación entre cuentas de la Muestra y cuentas de la Radioactividad de Fondo. (Davidson y Feigelson, 1957).

3.9. Posición de los Discriminadores

La eficiencia más alta se obtiene al contar en una ventana que incluye el espectro energético completo de la radiación emitida por la muestra. Sin embargo, esta no es forzosamente la mejor pòsición operativa. En realidad, los niveles de los discriminadores se fijan buscando un compromiso entre la necesidad de un número de cuentas por unidad de tiempo suficientemente alto para minimizar el error estadístico y la necesidad de obtener una Radioactividad de Fondo mínima, (Davidson y Feigelson, 1957).

3.10. "Apagamiento" de la luz emitida

Hemos dejado para el final este factor porque en el terreno de la operatividad real es el que más influencia suele tener sobre la eficiencia de contaje y, asimismo, al que más puede hacer variar esta eficiencia al contar una muestra u otra dentro de un mismo grupo.

El apagamiento de la luz emitida, es decir, la absorción de la luz dentro del vial sin llegar a los tubos Fotomultiplicadores, puede deberse a la propia Mezcla de Centelleo o a la Muestra; el primero se denomina "Autoapagamiento", el segundo "Apagamiento de la Muestra", y puede ser "Apagamiento por Color" o "Apagamiento Químico".

AutoApagamiento

Los solventes usados son transparentes en las regiones del espectro visible y próxima a la ultravioleta, y los solutos o centelleadores son seleccionados de acuerdo al criterio de que su espectro de absorción está suficientemente desplazado de su espectro de emisión para dar una transmisión razonable. (Swank, 1958; Seliger, 1958; Swank, 1954).

Pero si representamos graficamente la altura de pulsos contra concentración de centelleadores, vemos que la primera sube al principio al aumentar la ^{cen}tración, pero después

llega a una meseta cuando la energía de transferencia del solvente al soluto ya no está limitada por el número de moléculas de soluto disponibles. Un incremento subsiguiente de la concentración resultará entonces en una altura de pulsos disminuída por absorción de la luz el soluto o centelleador.

Los mecanismos de autoapagamiento aún no están completamente diluciados y tienen menos importancia dentro de los límites prácticos de conteo que el apagamiento en la muestra.

Apagamiento en la muestra

Como hemos dicho, puede tener lugar a través de la absorción de la luz en el espectro visible por sustancias coloreadas existentes dentro de la muestra, (Una excelente revisión de este problema ha sido hecha por Jaffee y Ford, (1966) o bien, por una variedad de mecanismos que interfieren en alguna forma con el proceso de centelleo (Kallman y Furst, 1956), y que se engloban en la denominación de "apagamiento químico". El apagamiento puede producirse cuando existen moléculas distintas de los centelleadores que absorben la energía de excitación del solvente y la degradan a alguna otra forma de energía distinta de la luz visible, o cuando algunas moléculas absorben la energía de excitación en uno de los solutos, primario o secundario, antes de que pueda emitirla como luz.

En este sentido, cualquier molécula de un soluto no fluorescente presente en la mezcla actúa como "Apagador" al no contribuir al proceso de centelleo. Estos Apagadores varían mucho en la intensidad con que interfieren en la conversión de la energía excitatoria luminosa, y en la transmisión de la luz al fototubo, habiéndose clasificado en Apagadores Fuertes, "Apagadores" "Medios" y "Diluyentes".

Existen un número considerable de sustancias que pueden actuar como apagadores, especialmente en las muestras biológicas como la orina o la sangre. El oxígeno y el agua son apagadores bien conocidos, así como un número de otros compuestos orgánicos, halogenados, alcoholes, ácidos, etc., revisados recientemente por Jaffee y Ford (1970).

Como hemos dicho el apagamiento es uno de los factores con más influencia sobre la eficiencia de conteo obtenida y puede variar considerablemente de una a otra muestra dentro de un mismo grupo lo que hace necesario el determinar el grado de apagamiento y la eficiencia de conteo para cada muestra a contar individualmente por alguno de los métodos que a continuación discutiremos.

4. METODOS DE DETERMINACION DEL GRADO DE APAGAMIENTO Y LA EFICIENCIA DE CONTEO.-

La actividad de una muestra radioactiva se estima, como

hemos dicho, en términos de la razón del número de cuentas registradas a lo largo de un intervalo de tiempo y la eficiencia de detección del contador.

Actividad muestra(dpm) = Cpm registradas / Eficiencia de Contaje

De donde:

Eficiencia de contaje = Cpm registradas / Actividad de la muestra (dpm)

Aunque, teniendo en cuenta la Radioactividad de Fondo, para el cálculo de la actividad real, debemos usar las cpm netas en lugar de las cpm registradas.

Cpm netas = Cpm registradas - Cpm Radioactividad de Fondo

La determinación de la Radioactividad de Fondo ha sido estudiada para diversos tipos de muestras (Scales, 1963; Herberg 1960) atendiendo a los factores responsables de ella (Herberg, 1958) o a aspectos prácticos como la relación óptima entre el tiempo de contaje de la muestra en blanco y el de la muestra radioactiva (England y Miller, 1969).

Como la eficiencia de contaje no puede no puede determinarse a partir de los factores que hemos discutido en el apar_

tado anterior, la determinación debe hacerse comparando la muestra desconocida con una conteniendo una cantidad conocida de radioactividad que ha sido contada en las mismas condiciones.

Si todas las muestras tuviesen un volumen y una composición química uniformes, o si no se presentaran efectos de apagamiento al cambiar la composición, las cpm registradas por el contador serían proporcionales a sus actividades específicas, y las actividades absolutas podrían ser determinadas preparando una muestra similar de actividad conocida. Davidson y Feigelson (1958), han revisado toda una serie de técnicas operativas de determinación de la eficiencia. Por ejemplo, si la única variación en la composición de la muestra estriba en la concentración del compuesto que contiene el radioisótopo, y la eficiencia es dependiente de esta concentración, puede usarse una curva de calibración asumiendo que la concentración es conocida independientemente (Peng, 1960).

Sin embargo generalmente no se conoce bien la composición de las muestras, y la eficiencia de conteo debe ser determinada individualmente para cada una. Los métodos corrientemente usados para esta determinación son (Dobbs, 1963)%

4.1. Standardización Interna

Consiste en añadir a la muestra una cantidad conocida del mismo isótopo que contiene, una forma que no aumenta el

apagamiento, y volver a contar la muestra. La actividad del standard interno añadido deberá ser mucho más grande que la de la muestra, en orden a obtener una buena estadística de conteo, pero no tan grande que las actividades del standard interno y de la muestra sumados introduzcan pérdidas en coincidencia (Davidson y Feigelson, 1957). La eficiencia de conteo se determina según la fórmula

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{cpm Muestra S.I.} - \text{cpm Muestra}}{\text{Actividad del standard Interno (dpm)}}$$

Este método solo es válido cuando la eficiencia de conteo de la muestra no es alterada por la adición del standard interno. Para ello, el volumen de la solución añadida debe ser lo bastante pequeño para no diluir significativamente la muestra, aunque no tan pequeño que no pueda medirse con precisión, con lo que no sabríamos la cantidad de radioactividad añadida; el volumen generalmente usado es de 0,1 ml.

Este método es el mejor para muestras de marcaje simple y de apagamiento intenso, tanto de color como químico. Sus principales inconvenientes están, por una parte en el tiempo y manipulación (con los posibles errores inherentes) que requiere para añadir el standard y volver a contar todas las muestras, y, por otra parte, en la alteración que se realiza sobre la muestra, que puede hacerla inservible para otro fin al que se la destinara tras el conteo,

(Rogers y Moran, 1966), o para un nuevo contaje.

4.2. Cociente de Canales

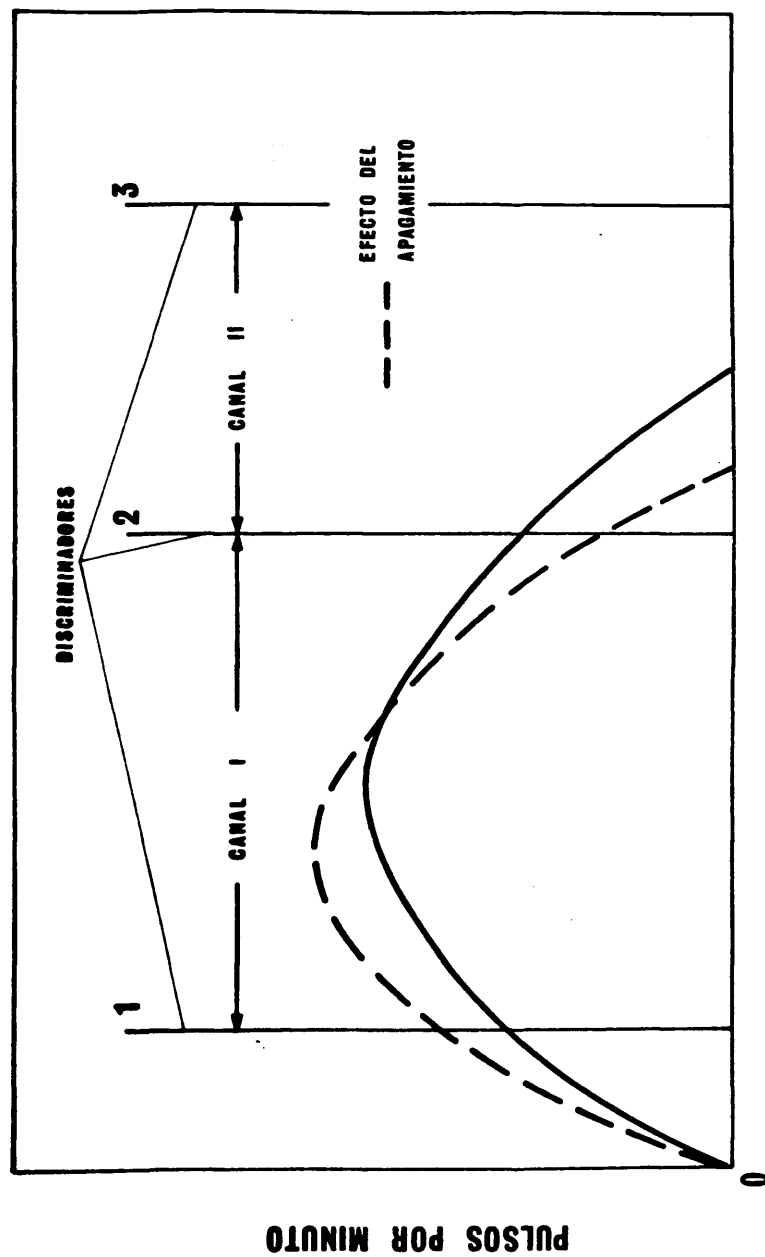
Este método igual que el de standardización externa que discutiremos a continuación es puramente instrumental, no requiere preparación de múltiples muestras, ni alteraciones permanentes de la muestra.

El método fue descrito originalmente por Baillis (1960) y elaborado posteriormente por Bush (1963), basandose en una comparación del número de cuentas registrado en dos canales que comprenden distintas zonas del espectro de emisión del radioisótopo a contar (siendo el Contador de Centelleo Líquido un contador proporcional la distribución de altura de pulsos tendrá la misma forma del espectro de emisión del isótopo) según se ve en la figura 18 . En ausencia de apagamiento la relación entre las cuentas registradas en uno y otro canal es constante, pero cuando existe apagamiento tiene lugar una disminución en la luz emitida por la muestra, resultando en una disminución de la altura de pulsos con un desplazamiento del espectro. (Figura 18).

Este desplazamiento se traducirá en un cambio de la relación entre las cuentas acumuladas en uno y otro canal que será proporcional al grado de apagamiento.

FIGURA 18

**ESPECTRO IDEALIZADO DE PULSOS MOSTRANDO EL DESPLAZAMIENTO
DEBIDO AL APAGAMIENTO**



que las muestras coloreadas tienen una curva diferente de las incolores, especialmente para el C-14.

4.3. Standardización Externa

En este método se coloca una fuente de radiación gamma cerca (debajo o lateral) de la muestra a contar durante el intervalo de standardización. La radiación gamma interacciona con la muestra liberando electrones Compton (Dewachter y Fiers, 1967; Horrocks, 1964) que producen luz al actuar sobre las moléculas de los centelleadores, exactamente en la misma forma que las partículas beta, y con una eficiencia que dependerá del grado de apagamiento.

Las cpm netas obtenidas para la fuente gamma dependerán de varios factores además del apagamiento, tales como la posición de la fuente respecto al vial en la cámara de conteo, el espesor del vial, el volumen de la muestra, y su densidad electrónica, que es función de su composición química.

Para minimizar los errores y el número de curvas de calibración necesarias, (p.e. para diferentes solventes o volúmenes de muestras), las cpm absolutas de la fuente gamma pueden ser reemplazadas por la razón de sus cpm en dos canales, ya que esta razón es tan sensible al apagamiento como la razón de las cuentas beta, pero es menos sensitiva a la mayor parte de los otros factores. (Dewachter y Fiers, 1967;

Horrocks, 1964; Higashimura y cols, 1962)

Para este método se requieren dos contajes: con y sin exposición a la fuente de standardización externa. El primer contaje no necesita ser largo (usualmente un minuto o menos) puesto que la fuente es de bastante actividad como para dar un número de cpm alto en un tiempo corto.

La ventaja principal de este método sobre el de cociente es la reducción en el tiempo de contaje para muestras de baja actividad al poder contar la muestra en un canal amplio en lugar de dos canales de menor anchura. (Rogers y Moran, 1966). Asimismo, este método suministra mejor estadística de contaje incluso con muestras con grado de apagamiento muy alto. Sin embargo, recientemente Springell (1969) ha señalado que para muestras biológicas preparadas por adición de solubilizadores, el método de standardización externa es inferior al de standardización interna, ya que la fuente gamma de un contaje más elevado en las muestras con más apagamiento y viceversa. Este factor corroborado en nuestras pruebas fué tenido en cuenta al elegir muestras técnicas de preparación de muestras como veremos más adelante. En general pues, este método es el menos exacto, particularmente para muestras de apagamiento intenso. Además, las variaciones en la geometría entre la fuente externa y la muestra, y los cambios en el volumen de la muestra, pueden introducir errores. En cuanto a la posi_

ción de los discriminadores y las amplitudes de ventana a utilizar dependerán de una serie de factores que han sido analizados por Davidson y Feigelson (1957). Diremos solo que el canal de conteo se selecciona en orden a obtener una relación óptima entre la Eficiencia de Contaje y la Radioactividad de Fondo; a esta relación se la denomina "Cifra de Mérito".

$$\text{Cifra de mérito} = (\text{Eficiencia Contaje})^2 / \text{Radioactividad de Fondo}$$

$$\text{C.D.M.} = E^2 / F$$

Putman (1969) introdujo el criterio S^2/B es decir la relación entre las cpm para la muestra sin apagamiento y las cpm de fondo en el mismo canal, más simple de determinar que el anterior, aunque Porgess (1968) ha prevenido contra su uso especialmente cuando S no es mucho mayor que B .

En los últimos años (Parmentier y Tenthaaf, 1969; Hansen y Carroll, 1971) se ha iniciado el uso de los computadores digitales para el análisis de los datos suministrados por el Contador de Centelleo Líquido, habiéndose desarrollado una serie de métodos para la corrección del efecto del Apagamiento en las muestras sobre la Eficiencia de Contaje y la determinación de esta.

Carroll y Houser (1970) han descrito tres programas para

determinar la Eficiencia de Contaje por el Método del Cociente de Canales para simple y doble marcaje, ajustando la relación Eficiencia / Cociente de Canales a un polinomio de grado creciente hasta obtener un ajuste satisfactorio. Hansen y Carrol (1971) han publicado un estudio similar para el método de Standardización Externa discutiendo el problema básico de estos procedimientos: la elección de la curva teórica de calibración que mejor se ajuste a los datos experimentales. Barber y cols. (1971) han desarrollado programas muy flexibles para Standardización Interna y Externa, y Marcaje Doble o Simple. Little (1970), Spratt (1970) y Grower y Bransome (1970) han discutido también varias técnicas para análisis de datos del Contador de Centelleo Líquido.

Algunos fabricantes ofrecen ya computadores digitales para el procesado de datos de sus Contadores de Centelleo Líquido, como el PDS-3 de Nuclear-Chicago con una memoria de 4K susceptible de expansión hasta 65K. Una alternativa distinta ha sido ofrecida por Packard Instruments Co. con su Analizador de Actividad Absoluta adaptable a sus modelos de la serie 3000.

Sin embargo, en la práctica corriente, puede resolverse el problema del ajuste de una curva teórica de calibración a la relación Eficiencia / Cociente de Canales o Eficien_

cia / Cociente de Canales para el Standard Externo con sistemas menos sofisticados.

Los Calculadores Programables de sobremesa han demostrado su utilidad para realizar los cálculos necesarios para determinar la Eficiencia de Contaje de las muestras y sus Actividades Absolutas, corrigiendo el Apagamiento por el método de Cociente de Canales o el de Standardización Externa cuando el grado de apagamiento no es excesivo. Cuando el apagamiento es demasiado grande, los cálculos necesarios para ajustar la relación Eficiencia / Cociente de Canales a un polinomio de tercer o cuarto grado, pueden sobrepasar la capacidad del calculador o hacer el proceso poco económico en relación a la estimación gráfica.

Williams y cols. (1970) han discutido el uso de estos microcomputadores (IME 86S) para corregir el apagamiento por Standardización Externa aunque no publican el programa utilizado.

Nosotros hemos utilizado el calculador Programma 602 de Olivetti para este mismo fin, ajustando la relación Eficiencia / Cociente de Canales para el Standard Externo a un polinomio de segundo grado por el método de mínimos cuadrados.

5. MEZCLAS DE CENTELLEO.-

Hasta aquí nos hemos referido principalmente a las características y técnicas "instrumentales" del Contador de Centelleo Líquido, pero sería incompleta esta revisión si no discutieramos también algunas de las características de las soluciones detectoras o mezclas de centelleo, que constituyen el verdadero núcleo del Contador de Centelleo Líquido, y de cuya adecuada elección y preparación dependerán los resultados que obtengamos.

Vamos pues a revisar superficialmente los componentes fundamentales de estas mezclas, preferentemente de las usadas para la determinación de tritio en muestras acuosas.

5.1. Solventes

Las características principales que debe reunir un solvente son:

- 1.- Debe transferir eficientemente la energía de excitación.
- 2.- Debe tener un coeficiente de absorción para la luz baja.
- 3.- Debe ser capaz de disolver el tipo de muestra que vayamos a utilizar.

La clase de compuestos eficientes de todos los estudiados ha sido la de los Alkilbenzenos. (Davidson y Feigelson, 1957;

Hayes y cols, 1955; Hayes, 1953). El Tolueno es uno de los más ampliamente usados, aunque también han sido empleados los etilbencenos y el Fenilciclohexano, algo menos eficientes pero con algunas propiedades interesantes para aplicaciones especiales. Un segundo grupo, menos eficientes pero muy útiles para cierto tipo de muestras, son algunos de los éteres (Davidson y Feigelson, 1957). El Anisol (Metoxibenceno) y el 1,4 p-Dioxano son los más importantes. El 1,4 p-Dioxano tiene una eficiencia de aproximadamente un 70% la del tolueno, pero es muy usado por su miscibilidad en agua.

Para sumarizar los más importantes solventes, reproducimos una tabla de Kerr, Hayes y Ott (1957), en que dan las eficiencias de conteo de distintos solventes con un 0,3% de PPO, comparadas con la eficiencia del tolueno.

■ Eficiencias de Contaje de Distintos Solventes

<u>Compuestos</u>	<u>Eficiencia</u>
Tolueno	100
Anisol	100
Xileno	100
Heptano	70
1,4-Dioxano	70
1,2-Dimetoxistano	60
Dietilenglicol	32

Acetona	12
Eter Etilico	4
Etilenglicol	0

Frecuentemente se utiliza una mezcla de Solventes en lugar de uno solo. La adición de uno o más solventes al solvente primario puede servir a dos funciones:

- 1.- Puede ayudar a hacer una solución homogénea con muestras que no son muy solubles en un solvente que tiene buenas características de transferencia energética.
- 2.- Puede mejorar la transferencia de energía de un solvente en que la muestra es muy soluble.

De estos solventes secundarios los más interesantes para nosotros son el Naftaleno y los éteres de Etilenglicol.

En 1955, Hayes, Rogers and Sanders (1955) encontraron que la adición de Naftaleno como solvente secundario mejoraba enormemente la eficiencia de conteo; para mezclas acuosas, la adición de un 10% de Naftaleno aumentaba la eficiencia del dioxano con un 20% de agua, de un 70% a un 80%, disminuyendo apreciablemente el grado de apagamiento químico.

Como veremos más adelante, desde entonces el Naftaleno es un componente obligado en todas las mezclas de centelleo basadas en dioxano, para el conteo de mezclas acuosas.

(Un estudio más detallado del Naftaleno como solvente secundario ha sido hecho por Rapkin (1964), Pinaud y cols, (1968) y Davidson y Feigelson (1957).

Los éteres de etilenglicol ayudan a elevar el contenido acuoso al sistema sin perder homogeneidad la solución (White, 1968; Parmentier y Ten Haaf, 1969), y no tienen efecto apreciable sobre el grado de apagamiento.

Constituyendo los solventes la mayor parte de la mezcla de Centelleo su grado de pureza es importante para mantener una eficiencia alta. Esto es particularmente cierto en el caso del dioxano, que tiende a formar peróxidos, apagadores fuertes, cuando está almacenado.

5.2. Solutos Primarios

Los mejores compuestos ensayados son aquellos que contienen anillos aromáticos conjugados. Los solutos primarios deben tener alta solubilidad en los solventes primarios y son eficientes en extraer la energía de excitación del solvente. Los solutos que han sido hallados más útiles son: (Swank, 1954; Hayes, 1956; Ott, 1958; Rapkin, 1964; Parmentier y Ten Haaf, 1969).

"P.P.O." 2,5 Difeniloxazol:

156.

Está considerado como el mejor soluto primario para aplicaciones generales, y especialmente para contar sistemas acuosos. Su emisión máxima está próxima a los 3800 Å.

p-Terpenil:

Es uno de los más eficientes y más usados en los sistemas basados en tolueno, pero su solubilidad a bajas temperaturas es limitada y es poco eficiente en sistemas acuosos. Emisión máxima a 3500 Å aproximadamente. (Figura 19)

Butil - PBD

2 - (4'-t-butylfenil) - 5 (4" bifenilil) - 1,3,4 oxadiazol. De características similares al anterior.

BBOT , 2,5 bis (2 -(5 butilbenzoxalolil)) - tiofeno.

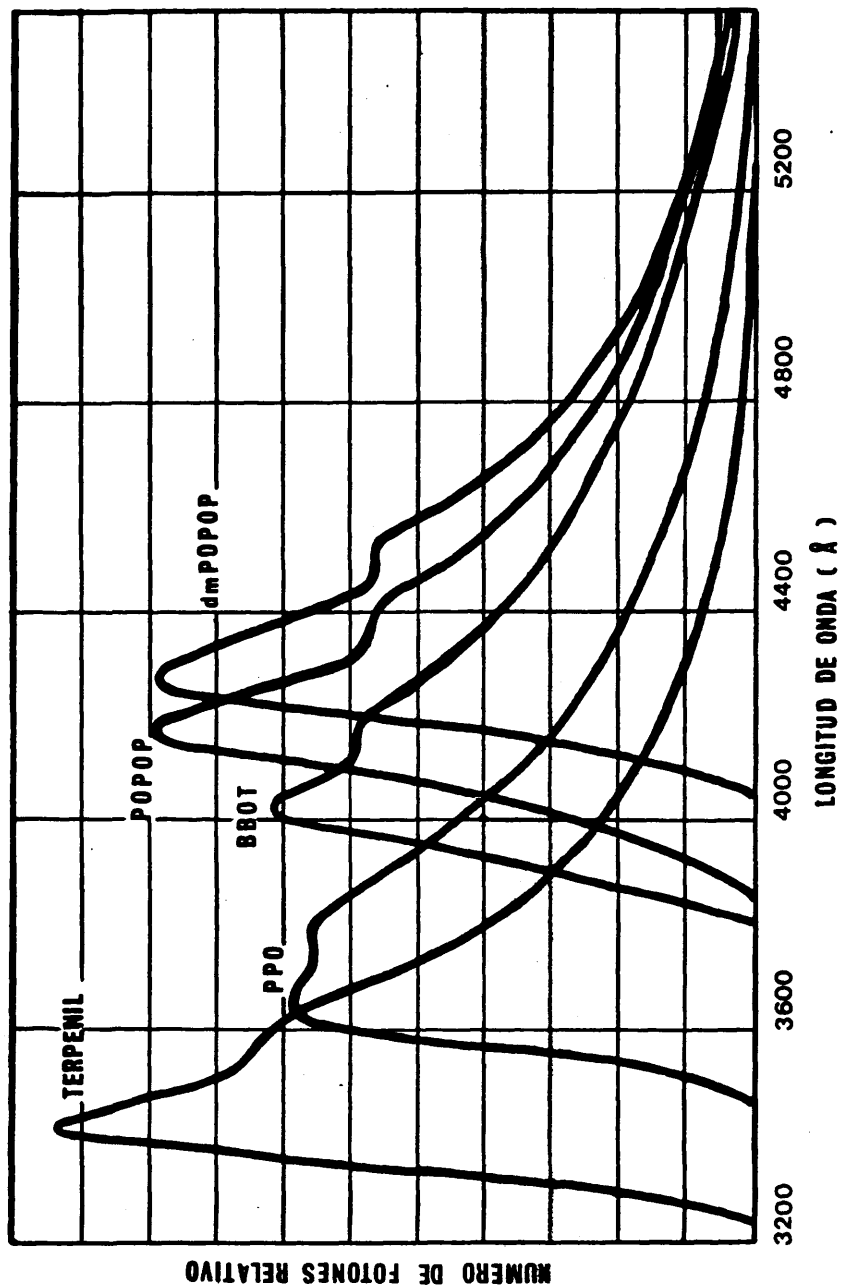
Emite a 4350 Å aproximadamente y no requiere soluto secundario. Menos eficiente que el PPO y mucho menos soluble en presencia de agua.

5.3. Solutos Secundarios

Emiten luz con una longitud de onda mayor, que se acoplan mejor con la curva de respuesta del fotocátodo y es menos

FIGURA 19

ESPECTROS DE EMISION DE LOS
SOLUTOS MAS USADOS:



(Rapkin, 1963)

absorbida en la muestra y el vial. Además pueden contrarrestar algunos de los efectos de apagamiento sobre los solutos primarios. Los más usados (Swank, 1954; Hayes, 1956; Ott, 1958; Rapkin, 1964; Parmantier y Ten Haaf, 1969) son:

POPOP, p - bis -(2 - (5 Fenil oxazolil) benceno.

Es el más empleado, su emisión máxima ocurre a 4200 Å aproximadamente para usos generales.

Dimetil - POPOP, p - bis (2 - (4 metil -5- feniloxazolil)) benceno.

Es el más soluble que el POPOP especialmente en sistemas con contenido acuoso. Su emisión máxima es a 4300 Å aproximadamente.

Como puede imaginarse, las posibilidades de combinación de estos elementos son muy grandes, variando tipo y cantidades de solventes y solutos para cada aplicación en particular; el número de mezclas descritas en la literatura va casi paralelo al número de autores, y una revisión de las más importantes sólo, iría mucho más allá de los objetivos de esta tesis.

Excelentes revisiones de este tema pueden encontrarse en Rapkin (1964), Parmentier y Ten Haaf (1969) Nuclear-Chicago (1967) y Davidson y Feigelson (1957). Nosotros, vamos a

limitarnos a los sistemas usados para conteo de Tritio en muestras líquidas homogéneas (revisados por Moghissi y cols, 1969; y Dobbs, 1968), y, dentro de ellos, a los utilizados cuando la muestra es agua o soluciones acuosas.

Muchos de los sistemas descritos en años anteriores (Rapkin, 1964) respondían a necesidades instrumentales que han sido superadas por los modernos aparatos, haciendo estos sistemas imprácticos hoy. Por ejemplo, algunas mezclas estaban concebidas para temperaturas de operación que son innecesariamente bajas para los modernos contadores de bajo ruido térmico. También, los nuevos tubos fotomultiplicadores no obtienen a veces el mejor acoplamiento espectral con solutos secundarios que se venían utilizando en algunos sistemas, necesitando otros, etc.

Teniendo esto presente vamos a citar sólo algunas de las mezclas más usadas actualmente para la determinación de Tritio en muestras acuosas.

Una de las características comunes a todas ellas es que el sistema solvente está basado en un solvente primario polar, generalmente el 1,4 Dioxano, para obtener buena miscibilidad con el agua o soluciones acuosas. Como solvente secundario se ha utilizado comunmente el Naftaleno, para mejorar la transferencia de energía del Dioxano en presencia del apagamiento químico del agua. También se suelen añadir al

gunos glicoles y alcoholes (Turner, 1967; Furst y cols, 1955) (76, 77) para bajar el punto de congelación del Dioxano Puro (-12°C).

Otro sistema solvente para mezclas acuosas ha sido el Tolúeno-Etanol, menos utilizado que el anterior porque usualmente no puede contener más de un 2-3% de agua.

Probablemente, una de las mezclas de centelleo más ampliamente usadas para el conteo de agua y soluciones acuosas, es la descrita por Bray (1960) que consiste de:

Naftaleno	60 gr.
Metanol	100 ml.
Etilenglicol	20 ml.
PPO	4 gr.
POPOP	0,2 gr.
Dioxano c.s.p.	1 litro.

Esta mezcla, además de para el agua es adecuada para el conteo de soluciones acuosas de sales o azúcares y puede contener hasta un 30% de agua a -8°C sin perder homogeneidad la solución. La eficiencia obtenida para Tritio es baja, dado que, al trabajar a una temperatura baja la cantidad de Naftaleno añadida no puede ser suficientemente alta. Sin embargo, con algunas modificaciones este sistema puede ser muy útil.

Butler,(1961), describió otra mezcla para determinación de Tritio en agua compuesta de:

Naftaleno	120 gr.
PPO	4 gr.
POPOP	0,05 gr.
Bioxano	1000 ml.

Esta mezcla ha sido bastante utilizada, especialmente desde que Sodd y Scholz (1969) consiguieron que fuera aceptada como método oficial de determinación de tritio en agua o soluciones acuosas por la Association of Official Analytical Chemists de E.E.U.U. Las eficiencias para tritio obtenidas con ella son bajas, sin embargo, debido a las bajas concentraciones de los solutos y, frecuentemente, como describimos en el capítulo de Resultados, se produce la congelación de la mezcla con muestras acuosas de pequeño volumen, cuando las características de ruido térmico del contador utilizados obligan a mantener la temperatura en las proximidades de 0°C.

Otra de las mezclas más corrientes es la descrita por Davidson y Feigelson en (1957), cuya característica diferencial más importante es la utilización del Anisol (Metaxibenceno) como solvente secundario añadido al Dioxano.

La composición completa es:

Dioxano	6 partes
Anisol	1 parte
Dimetoxietano	1 parte
PPO	12 gr/litro
POPOP	0,4 gr/litro

Las eficiencias obtenidas con esta mezcla son más bajas que las suministradas por aquellas otras que llevan Naftaleno para mejorar la transferencia energética del Dioxano. Además, la concentración alta del soluto primario, 12 gr/l, eleva demasiado el coste de la mezcla sin aumentar proporcionalmente la eficiencia.

Existen además un cierto número de mezclas de centelleo comerciales tales como por ejemplo NE-220 y NE-240 (Nuclear Enterprises Ltd., England) DEM y TED (Panax Equipment Ltd. England) Scintols 2 y 5 (Thorn Electronics Ltd., England) Permablend I, II, y III y Permafluor (Packard Instruments Co. USA), etc, que evitan al investigador el invertir tiempo en la preparación de la mezcla, pero, generalmente (White, 1968) su elevado coste y no demasiado alta la eficiencia no compensan esta pequeña ventaja.

6. PREPARACION DE MUESTRAS.-

Los solventes utilizados para las mezclas de centelleo pertenecen, como hemos visto, en su mayor parte a los hidrocarburos aromáticos; esto limitaba el tipo de muestras que pueden ser contadas a aquellos compuestos, o mezclas de compuestos, solubles en dichos solventes.

Los esfuerzos para obviar esta dificultad (Bell y Hayes, 1958) se encaminaron hacia dos objetivos; Primero, el que ya hemos visto de obtener sistemas solventes con capacidad para contener soluciones acuosas en mezcla homogénea, y segundo, desarrollar métodos de solubilizar la muestra en la mezcla de centelleo, y/o disminuir el grado de apagamiento químico o de color, para permitir la utilización de sistemas solventes más universales pero de eficiencias bajas.

Los medios usados han sido para estos fines muy diversos (Bell y Hayes, 1958; Rapkin, 1964; Parmentier y Ten Haaf, 1969). Por ejemplo introducir la muestra en la mezcla de centelleo como una mezcla coloidal, con Triton-X-100 o compuestos similares, (Parmentier y Ten Haaf, 1969), formando complejos o sales para obtener compuestos solubles (Owen, 1960) o, convirtiendo o degradando el material de la muestra para obtener compuestos solubles.

También se han desarrollado métodos para montar la muestra

sobre papel o film, se ha utilizado centelleadores sólidos para contener la muestra en su interior, etc. (Parmentier y Ten Haaf, 1969).

Una revisión de estas técnicas, al igual que ocurría en el apartado anterior, excedería con mucho los objetivos de esta tesis, por lo que nos limitaremos a describir algunas de las utilizadas para las muestras de materiales biológicos conteniendo agua tritiada.

Los fluidos biológicos (orina, sangre, fluido sinovial, etc.) presentan dos tipos de problemas, primero, el de su solubilización en la mezcla de centelleo, y segundo, el elevado grado de apagamiento que generalmente presentan.

Hay en la literatura (Parmentier y Ten Haaf, 1969; Rapkin, 1969) un gran número de referencias sobre la determinación de Tritio en Orina en el Contador de Centelleo Líquido. Como podría esperarse, la mayor atención se ha dirigido a los problemas asociados con el color.

Sin duda el método más simple de los sugeridos es el que consiste meramente en la dilución con agua destilada (Oliveiro y Davidson, 1962) que ofrece la doble ventaja de reducir la intensidad del color y evitar la precipitación de sales y proteínas cuando la orina diluida es añadida a los solventes orgánicos de la mezcla de centelleo. Sin embargo, esta

reducción en apagamiento por color no siempre compensa la elevación del apagamiento químico introducido por el agua añadida.

Cuando además los niveles de actividad no permiten tal dilución, se han utilizado otros medios de decoloración. El tratamiento con carbón activado seguido de filtración fue una de las primeras propuestas, (Rapkin, 1969) aunque las ganancias en eficiencia no fueron muy altas.

También se ha intentado la precipitación de los cuerpos coloreados con Acido Tricloro-Acético al 10% (TCA) (Langham y cols., 1956) aunque siendo las sustancias ácidas apagadores muy fuertes, el apagamiento químico a veces superaba al de color, pudiéndose decir lo mismo de la decoloración con peróxido de hidrogeno.

Ante la poca efectividad de estos métodos de decoloración, se ha recurrido, cuando la actividad está presente en forma de Agua Tritiada, a la destilación del agua a partir de la orina. Todas las técnicas de separación del agua de los sólidos han sido utilizadas, incluyendo Liofilización (Moss, 1964), destilización en presencia de benceno (Werbiny y cols 1959), y destilación en vacío. (Mc Taggart y Cardus, 1968).

Estas técnicas tienen la ventaja de dar una mejor estimación de la actividad específica de la muestra al poder medir el

volumen de la muestra más exactamente, sin el desplazamiento del agua del volumen pipeteado debido a la presencia de sólidos en suspensión.

Las técnicas de determinación de Tritio (como agua tritiada) en muestras de sangre son tan abundantes en la literatura (Parmentier y Ten Haaf, 1969) como las de orina, aunque los factores que influyen en la preparación de muestras en este caso son un poco diferentes. Por una parte los volúmenes de muestra disponibles suelen ser menores que para la orina. Además, el contenido sólido de la sangre, (aproximadamente 20%) es bastante mayor que el de la mayor parte de las muestras de orina, lo que en ocasiones conduce a precipitaciones molestas.

Afortunadamente para la determinación del agua corporal total podemos utilizar muestras de plasma o suero, ya que en este es donde estará el agua tritiada, en lugar de sangre entera.

El plasma o el suero presentan también el problema del color y al igual que con la orina se han ensayado técnicas de decoloración (Langhan y cols, 1956) sin que los resultados hayan sido demasiado buenos. También diversos autores (Parmentier y Ten Haaf, 1969; Werbin y cols; 1959; Mc Taggart y Cardús, 1968) han utilizado los métodos de destilación antes descritos con resultados satisfactorios en general, si

de discuten las desventajas del tiempo consumido y los errores que pueden surgir a través de la manipulación de las muestras.

Un enfoque más simple al problema ha sido sugerido por otros autores (Chaudhuri y Yadav, 1969; Kragelund y Dyrbye, 1966) consistente en usar estos fluídos sin ningún tipo de preparación, utilizando una mezcla de centelleo de buenas características de solubilidad y alta eficiencia. Este tipo de métodos es válido siempre que los volúmenes de muestra sean lo bastante pequeños para minimizar el apagamiento químico que pueden originar.

Finalmente, una importante innovación en la preparación de muestras biológicas para espectrometría de Centelleo Líquido la ha constituido el empleo de agentes solubilizadores, tales como el NCS, el Hidróxido de Amonia 10-X (Rapkin, 1961) y otras bases de amonio cuaternario, y de gelificadores como el Triton X-100. (Parmentier y Ten Haaf, 1969).

Chen (1958) ha utilizado el Hidróxido de Amonia (Packard Instruments Co., USA) como solubilizador para la determinación de Tritio en plasma, definiéndolo como un método simple, rápido y preciso; aunque las eficiencias de conteo resultantes no fueron muy altas, con la moderna instrumentación da resultados muy satisfactorios.

Hansen y Bush (1967) han utilizado al NCS (mezcla de bases de amonio cuaternario, Nuclear Chicago Co., USA) para la solubilización de fluidos biológicos y tejidos blandos, con resultados algo superiores a los reportados para la Hiamina, y muy superiores a los obtenidos con soluciones alcohólicas de hidróxido potásico.

También la hiamina 10-X (en forma de Cloruro) ha sido usada con buenos resultados (Meade y Siglitz, 1962) en la solubilización de muestras de orina en mezclas de Tolueno. Estos agentes solubilizadores, así como el Triton X-100 (Fox, 1968; Lindsay y Kurnick, 1969) han sido usados asimismo para la solubilización de tejidos con resultados superiores a las técnicas de combustión (Parmentier y Ten Haaf, 1969).

Otra alternativa es la utilización de mezclas comerciales con agentes solubilizadores ya añadidos tales como Insta-Gel (Packard Instrument Co. USA) o Aquasol (New England Nuclear, USA) aunque también a ellas puede aplicarse lo que ya dijimos en el apartado de mezclas de centelleo.

PLANTEAMIENTO DE NUESTRA TESIS

Nuestra primera finalidad fué la elección de un método de estimación del Volumen de Agua Corporal Total mediante la dilución de Agua Tritiada que combinara la simplicidad y mínimas molestias para el sujeto de la determinación con una máxima exactitud y reproducibilidad.

Como hemos dicho en otro lugar, el problema básico planteado por un método de dilución es la determinación de la concentración de trazador en las muestras biológicas, por lo que en un principio nos dedicamos a hallar la manera más simple y eficaz de preparar estas muestras, y una Mezcla de Centelleo adecuada para ellas, que nos proporcionara una máxima Eficiencia de Contaje.

La primera Mezcla de Centelleo que probamos fué la descrita por Butler, pero encontramos en ella una baja solubilidad de la orina que nos obligó a abandonar su empleo.

Tras ello realizamos una determinación experimental de la composición óptima, en cuanto a concentración de solutos y solventes secundarios, de una Mezcla de Centelleo adecuada para muestras acuosas, para que nos sirviera de base a una selección entre las Mezclas descritas por diversos autores.

La Mezcla de Centelleo "Y" descrita por White (1968) fue la que mejor coincidió con nuestros resultados, por lo que la adoptamos para las determinaciones sucesivas.

En cuanto a preparación de muestras ensayamos en principio varios procedimientos simples de precipitación y dilución, cuyos resultados comparamos con los obtenidos prescindiendo de ningún tipo de preparación.

El hecho de que a veces eran necesarios volúmenes relativamente grandes de muestra, debido a su baja actividad específica de H^3 , que se traducían en una elevación considerable del grado de apagamiento, y la consideración de que los sólidos disueltos en el agua del plasma o la orina desplazan un cierto volumen de agua del volumen pipeteado, lo que representa una inexactitud en la determinación de la actividad específica de tritio en la muestra, nos decidieron a emplear la microdestilación en vacío de las muestras de plasma u orina según el procedimiento descrito por McTaggart y Cardus (1968), analizando previamente la posibilidad de un fraccionamiento isotópico entre el agua destilada y la muestra original, para descartar una posible fuente de error.

Los volúmenes de muestras requeridos por este procedimiento eran obviamente imposibles de obtener en experimentos

sobre animales, por lo que ensayamos la utilización de muestras de pequeño volumen, sin ninguna preparación previa, con la Mezcla de Centelleo "Y" de White, comparando los resultados con los obtenidos utilizando otras Mezclas y en la destilación en vacío de las muestras.

Nuestro segundo objetivo fue estudiar la cinética de distribución del agua tritiada en el organismo, con arreglo a los conceptos expuestos sobre cinética de trazadores, para probar la validez de algunas asunciones corrientes en los estudios hasta ahora publicados.

Para ello realizamos estimaciones de agua corporal en humanos, estudiando durante 48 horas la cinética del agua tritiada en el plasma y en la orina con el fin de elegir el número de muestras mínimas que nos permitiese definir con exactitud el volumen de distribución del agua corporal. Utilizamos muestras de plasma y orina para determinar con exactitud el punto de equilibrio de sus concentraciones en agua tritiada y, asimismo, para comparar la exactitud de la determinación de la actividad específica de tritio en cada tipo de muestra.

Los resultados obtenidos en estas determinaciones nos decidieron a estudiar la cinética del agua tritiada, en el periodo de tiempo previo al equilibrio, en el plasma, la orina, y otro compartimento corporal, el L.C.R., en comunicación con el plasma pero sin transferencia directa con el exterior.

CAPITULO CUARTO.-

MATERIAL Y METODOS.-

MATERIAL. -

1. EQUIPO.-

1.1. Contadores de Centelleo Líquido

Para la determinación de la actividad de Tritio en las muestras de plasma y orina se utilizaron dos contadores:

- a) Espectrómetro de Centelleo Líquido TRI-CARB, Modelo 314 A-X Packard Instrument Co. La Grange, Illinois, USA con estas características: sistema de coincidencia, dos canales de análisis, temperatura controlada (tubos fotomultiplicadores tipo S-11), y Cambiador de muestras automático (100 muestras).
- b) Contador de Centelleo Líquido Serie Mark II, Mod 4649. Nuclear Chicago Co., DesPlaines, Illinois, USA. Con las siguientes características: Sistemas de coincidencia, analizadores con 7 canales de análisis seleccionables, 2 canales independientes para Standardización externa (Fuente de Ba¹³³), temperatura controlada (Tubos Bialcali RCA 5075), cambiador de muestras automático (300 muestras), autocalibración automática y módulo de corrección de apagamiento por color y monitor de fluorescencia.

1.2. Sistema de Cálculo de Eficiencias de Contaje Compuesto por:

- a) Teletipo Mod. 8480, Teletype Inc., Chicago, Illinois,

USA. Para salida de datos del contador Marck II, impresos y en cinta perforada.

b) Lector de Cinta LN 20, Hispano-Olivetti Sa. Barcelona. Para entrada de datos en el Programa 602.

c) Microcomputador Olivetti Programa 602, Hispano-Olivetti, S.A., Barcelona. Con memoria de 36 registros numéricos y de programa, y programación por tarjeta magnética.

1.3. Centrifuga

La separación del plasma de las muestras de sangre se realiza en una centrífuga Janetzki T-31, autoequilibrable.

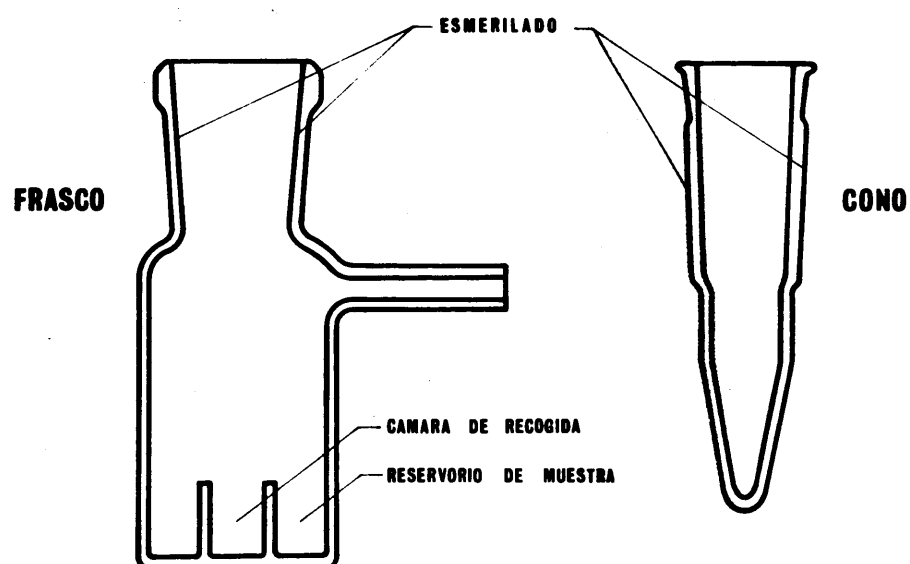
1.4. Balanzas

Las pesadas de los solutos para la preparación de las mezclas de centelleo se realizaron en una Balanza de Precisión Mettler H-15, E. Mettler, Zurich. El resto de las pesadas se efectuó en una balanza Mettler K7T, E. Mettler, Zurich.

1.5. Sistema de Destilación en Vacío

Los frascos para la destilación, según el modelo de McTaggart y Cardus (87) nos fueron hechos en vidrio Pyrex por la Casa POBEL, Madrid. Se utilizó una bomba de vacío IFA, Mod. FD 51-19, Instituto Torres Quevedo de Instrumental Científico, Madrid. (Figura 20)

FIGURA 20



**FRASCO DE MICRODESTILACION PARA DESTILACION EN VACIO
DE AGUA TRITIADA A PARTIR DE MUESTRAS BIOLOGICAS**

[Cortesía de los Dres. W. G. MCTAGGART y D. CARDÚS]

1.6. Jeringuillas

Para la extracción de muestras sangre se utilizaron jeringuillas de plástico estériles, desechables Ico-GAMMA, Ico-Bologna, Italia.

1.7. Pipetas

Para medir las muestras a contar en el Contador de Centelleo se utilizaron Pipetas Automáticas de 10, 100 y 200 microlitros de la casa EPPENDORF, Alemania.

2. AGUA TRITIADA.-

El agua tritiada utilizada para standardización nos fué suministrada (como H^3OH en agua) por The Radiochemical Center, Ref. Cat. TRY. 44 (Radioactivity Standard Catalogue, 1971, R.C.C. Amersham, Inglaterra) en ampollas de 5 ml. con una actividad total de 5 microCurios. El agua tritiada utilizada para las pruebas de determinación de agua corporal total nos la suministró el mismo centro en forma de H^3OH en agua, esterilizada y libre de pirógenos, apta para inyección, Ref. Cat. TRS. 1 P. (Radiopharmaceutical and Clinical Radiation Sources Catalogue, 1971, R.C.C. Amersham, Inglaterra) en ampollas de 1 ml. con la actividad total de 5 millicurios.

El agua tritiada esteril utilizada para los experimentos en animales nos fué suministrada por la Junta de Energía Nuclear, Madrid, en viales con un contenido de 1,24 ml. y una actividad total de 25 miliCurios.

3. SOLVENTES Y SOLUTOS.-

Los solventes utilizados en la preparación de las mezclas de Centelleo fueron los siguientes:

Dioxano: para mediciones de espinteriscopia, ref. cat. 3118. (Catalogo Merk 1971, E. Merk. Darmstadt, Alemania).

Naftaleno: para mediciones de espintariscopia. Ref. Cat. 6200 (Cat. Merck 1971).

PPO: 2,5 Difeniloxazol para espintariscopia. Ref. Cat. 2946 (Cat. Merck 1971). y Ref. Cat. 600 2023 (Catalog Packard 70/71, Packard Instruments Co.).

Dimetil POPOP: 2,2'-p - Fenilen - bis (4- metil- 5 - femiloxazol) para espinteriscopia ref. cat. 6002092 (Catalog Packard 70/71)

Etilenglicol: p.a. ref. cat. 9621 (Cat. Merk 1971)

Eter Etílico: p.a. ref. cat. 921 (Cat. Merk 1971)

4. VIALES.-

Se utilizaron viales de vidrio de bajo contenido en potasio 40, de polietileno moldeado. Packard Instruments Co., Inc.,

Illinois, USA, ref. 6008112 y 6008111 (Cat. Packard, 7o/71).

5. SUJETOS Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.-

Las pruebas de determinación del volumen de agua corporal total en humanos fueron realizadas en varones jóvenes de edades comprendidas entre 19 y 22 años, estudiantes de medicina que se ofrecieron voluntariamente para las pruebas. En el momento de realizar las determinaciones, todos se hallaban en buena salud, sin desórdenes metabólicos conocidos

Para las determinaciones en animales utilizamos gatos de ambos sexos.

METODOS.-

1. CONDICIONES DE CONTAJE

La posición de los discriminadores, alto voltaje aplicado a los fototubos, atenuación y amplitudes de ventana para la determinación de tritio en el contador TRI-CARB 314 A-X fueron fijadas experimentalmente realizando contajes repetidos de un standard de tritio en Tolueno (Actividad Absoluta 113.600 dpm), con amplitudes de ventana variables entre 100-200 y 100- ∞ (Unidades arbitrarias del contador), variando el alto voltaje a lo largo de toda la escala permitida por el instrumento, hasta obtener una "cifra de mérito" máxima.

$$\text{"cifra de mérito"} = \frac{(\text{Eficiencia})^2}{\text{Fondo}}$$

Es decir, hasta obtener una Eficiencia de Contaje máxima unida a una Radioactividad de Fondo mínima.

Las condiciones así determinadas fueron

Atenuación 1

Modo Análisis ON - 3

Alto Voltaje 3 - 500 (975 Volts aproximadamente)

Discriminadores:

AA' - 100

B - 250

C - 1000

Canal Rojo: 100 - 250

Canal Verde: 100 - 1000

En el contador Mark II se utilizaron el alto voltaje y las ventanas para tritio prefijadas por el fabricante.

2. DETERMINACIÓN DE LA EFICIENCIA

La corrección de Cpm netas a Dpm de Actividad real se realizó determinando la Eficiencia de Contaje por el método de Cociente de Canales, en el caso de muestras con suficiente actividad para no hacer excesivamente largos los tiempos de contaje, y por el de Standardización Externa en las muestras con baja actividad.

Un set de standards de tritio en tolueno con apagamiento químico (Packard Instruments Co., Inc.) fué contado previamente y en las mismas condiciones que cada grupo de muestras.

Para la determinación de la eficiencia por el primer método la relación entre eficiencias y cocientes de canales obtenidas para estos standards fué ajustada en la calculadora, Programma 602, por el método de los mínimos cuadrados a una ecuación exponencial de la forma:

$$Y_x = Y_0 \times e^{-kx}$$

en la que:

Y_x = Eficiencia de contaje de una muestra con un cociente de canales igual a x

Y_0 = Eficiencia de contaje de una muestra con un cociente de canales igual a 0

e = Base de los logaritmos naturales

k = Coeficiente de proporcionalidad para la curva de apagamiento

x = Cociente de canales

en el caso del TRI-CARB 314 AX.

Para el Mark II se encontró que la relación Eficiencia / Cociente de Canales podía ajustarse mejor a la ecuación de una recta en la forma:

$$Y_x = Y_0 - K X$$

donde Y_x , Y_0 , K y X expresan los mismos conceptos que en la anterior.

Para la determinación de la Eficiencia por el método de Standardización Externa, la relación entre las Eficiencias y Cocientes de Canales para el Standard Externo, obtenidas con los standards de apagamiento, se ajustó en la Programa 602 a una ecuación cuadrática de la forma

$$Y_x = ax^2 + bx + c$$

donde

Y_x = Eficiencia de contaje

x = Cociente de Canales para el Standard Externo

a, b , y c : Coeficientes para cada curva de apagamiento por el método de los mínimos cuadrados, resolviendo las ecuaciones

$$a \sum x^2 + b \sum x + n c = \sum y$$

$$a \sum x^3 + b \sum x^2 + c \sum x = \sum xy$$

$$a \sum x^4 + b \sum x^3 + c \sum x^2 = \sum x^2 y$$

Los coeficientes de correlación de Spearman obtenidos en estos ajustes no fueron nunca inferiores a 0,99.

Los coeficientes " Y_0 " y " K " en el método de Cociente de Canales y " a ", " b ", y " c " en el de Standardización Externa, fueron acumulados en la memoria de la Programma 602, utilizándolo para el cálculo de la Eficiencia de Contaje a cada muestra, aplicando las ecuaciones descritas.

Periodicamente se realizaron comprobaciones, representando graficamente las relaciones Eficiencia / Cociente de Canales, y, Eficiencia / Cociente de Canales para el Standard Externo, y cotejando los valores de eficiencia para cada muestra leídos en el gráfico con los computados, no excediendo en ningún caso la desviación de un 1%.

3. PREPARACION DE STANDARDS DE APAGAMIENTO

Se prepararon dos series de standards de apagamiento químico para comprobar si las curvas obtenidas con los Standards de Packard Instrument Co. eran adecuadas para la corrección del apagamiento presente en nuestras muestras.

La primera serie, de Apagamiento por Agua, fué preparada añadiendo a una serie deviales de vidrio conteniendo 10 ml. de mezcla de Bray, agua tritiada de referencia en una proporción de 1, 2, 3, 5, 8, y 10%. La actividad absoluta total contenida en cada vial fué de 210.000 dpm.

La segunda serie, con Apagamiento Químico más intenso, fué preparada adicionando Piridina en volúmenes de 0,125, 0,25, 0,5, y 0,75 ml., a una serie de viales de vidrio conteniendo cada uno 10 ml. de mezcla de centelleo de Bray y 0,2 ml. de agua.

Todos los viales fueron preparados por duplicado y sellados inmediatamente después con parafina líquida para prevenir la evaporación de los solventes.

4. MEZCLAS DE CENTELLEO

4.1. Solubilidad de la Orina en la Mezcla de Centelleo de Butler

Se disolvieron volúmenes crecientes de orina (0,1, 0,2,

0,5, 1, 2 y 3 ml.) en tres series de viales conteniendo 10, 15 y 20 ml. de mezcla de centelleo. Tras la adición de la orina los viales fueron agitados mecánicamente y dejados reposar durante 10 minutos antes de inspeccionarlos, utilizando como criterio de solubilización incompleta la apreciación a simple vista de una separación en las fases de la orina y la mezcla.

4.2. Determinación Experimental de la composición óptima de la Mezcla de Centelleo

4.2.1. Efecto de la concentración de PPO y de Dimetil-POPOP sobre la Eficiencia de Contaje

Se preparó una serie de mezclas de centelleo con un sistema solvente común de dioxano c.s.p. 1 litro y Naftaleno 120gr/l. en incrementos de 1 gr. en las que varió la concentración de PPO entre 1 y 10 gr /l. en incrementos de 1 gr. Para cada concentración de PPO se hizo variar la concentración de dimetil - POPOP entre 0,2 y 1 gr /l. en incrementos de 0,2 gr.

Con cada tipo de mezcla se prepararon 4 viales duplicados conteniendo cada uno 0,01 ml. de Agua Tritiada de Referencia con una Actividad Absoluta de 110.000 dpm por vial y 10 ml. de mezcla de centelleo.

4.2.2. Efecto de la Concentración de Naftaleno sobre la Eficiencia de Contaje

Se preparó una serie de mezclas conteniendo 8 gr. de PPO, 600 mgr. de Dimetil POPOP y Dioxano hasta 1 litro y con cantidades crecientes de Naftaleno entre 100 y 200 gr /l. en incrementos de 10 gr.

Con cada mezcla se prepararon 4 viales duplicados conteniendo 10 ml. de mezcla de centelleo y 0,01 ml. de Agua Tritiada de Referencia con una Actividad por vial igual que en el caso anterior.

Los viales preparados según se describe en este y el anterior apartado fueron contados durante 10 minutos en las condiciones ya descritas, determinando los cocientes de canales para usarlos como índice de apagamiento.

4.3. Comparación de distintas Mezclas de Centelleo para la determinación de Tritio en Muestras Biológicas

Las mezclas ensayadas fueron:

Mezcla de Bray (1960) (4 gr. PPO, 0,2 gr. POPOP, 100 ml. Metanol, 20 ml. Etilen Glicol, 60 gr. Naftaleno, Dioxano hasta 1 litro).

Mezcla de Butler (1961) (4 gr. PPO, 0,05 gr. POPOP, 120 gr.

Naftaleno)

Naftaleno, Dioxano 1 litro).

Mezcla X de White (1968) (8 gr. PPO, 0,6 gr. Dimetil POPOP, 100 ml. Metanol, 20 ml. Etilenglicol, 150 gr. Naftaleno, Dioxano hasta 1 litro)

Mezcla Y de White (1968) (8 gr. PPO, 0,6 gr. Dimetil POPOP, 100 ml. Eter Etílico, 20 ml. Etilenglicol, 150 gr. Naftaleno, Dioxano hasta 1 litro).

Instagel de Packard Instruments Co. Inc.

Con cada mezcla se prepararon 2 grupos de muestras viales de vidrio conteniendo 0,2 ml. de plasma u orina marcados con Agua Tritiada de Referencia (25 nC / ml), uno con 10 ml de mezcla y otro con 15 ml., para estudiar la relación existente entre el volumen porcentual de muestras y la eficiencia de conteo.

Los viales fueron contados durante 10 minutos en el TRI-CARB 314 AX en las condiciones reseñadas anteriormente y la eficiencia de conteo se determinó según la fórmula

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{Cpm netas} \times 100}{\text{Contenido en Dpm}}$$

Parte del Plasma y la orina marcados fueron destilados en vacío según la técnica de Mc Taggart y Cardus (1968), Se

tomaron alicuotas de 0,2 ml. del Plasma y la Orina marcados sin destilar y del agua destilada a partir de ellos, preparándose 4 grupos de 8 viales con estas alicuotas, añadiéndose a cada vial 10 ml. de la mezcla de Centelleo.

5. PREPARACION DE MUESTRAS

5.1. Plasma: Precipitación y Filtración

Método A: A un grupo de 10 viales conteniendo cada uno 1 ml. de Plasma marcado con agua tritiada (Actividad Específica 100000 Dpm / 1 ml. Plasma) se añadió 15 ml. de Mezcla de Centelleo de Butler por vial. Se esperó 1 hora para la sedimentación del precipitado formado por las proteínas del plasma al contacto con la mezcla de centelleo antes de contar las muestras.

Método B: Se prepararon otros 10 viales, haciendo precipitar las proteínas plasmáticas en un tubo de ensayo conteniendo 1 ml. de Plasma al que se añadieron 5 ml de mezcla de Centelleo. El contenido del tubo se transvasó al vial a través de un filtro de papel de filtro Whatman, lavando a continuación dos veces el precipitado en el filtro con 5 ml. de mezcla de centelleo cada vez.

Método C: Se siguió el mismo procedimiento pero utilizando alicuotas de 0,5 ml. de plasma en lugar de 1 ml.

Método D: En un tubo de ensayo conteniendo 0,5 ml. de Plasma se añadieron 0,5 ml. de Metanol p.a. Tras la participación de las proteínas el contenido del tubo de ensayo se trasladó al vial a través de un filtro de papel de filtro Whatman lavando el precipitado en el filtro 3 veces con alicuotas de 5 ml. de mezcla de centelleo que pasaban al vial

Método E: En un tubo de ensayo se añadió 0,65 ml. de una solución de Acido Tricloroacético p.a. al 10% a 1 ml. de Plasma. Tras centrifugar durante 20 minutos a 3000 rpm, se tomó una alicuota del sobrenadante de 1 ml. que fue pasada a un vial de conteo con 15 ml. de mezcla de centelleo.

Los 5 grupos de viales así preparados se contaron en el TRI-CARB durante 10 minutos en las condiciones habituales.

La eficiencia de conteo se determinó por la formula

$$\text{Eficiencia (\%)} = \frac{\text{cpm netas} \times 100}{\text{Contenido en Dpm}}$$

5.2. Orina: Decoloración

Se preparó un grupo de 10 viales de vidrio conteniendo 0,5 ml. de orina marcada con agua tritiada de referencia (Actividad 200.000 Dpm/ 1 ml. Orina) y 15 ml. de mezcla de centelleo de Butler siendo contados sin ninguna otra manipula_

ción.

En un segundo grupo se decoloró previamente la orina colocando 0,5 gr. de carbón activado en un embudo de Buchner con un filtro de vidrio fritado de poros finos, haciendo pasar la orina a su través succionando con una bomba de vacío. Se tomó una alícuota de 0,5 ml. de la orina filtrada y se pasó al vial conteniendo 15 ml. de mezcla de centelleo.

Todas las muestras fueron contadas durante 10 minutos en el contador TRI-CARB, determinándose la eficiencia de conteo igual que para las muestras de plasma.

5.3. Destilación en Vacío

La extracción de agua a partir de las muestras de plasma y orina se realizó por destilación en vacío en frascos similares a los descritos por McTaggart y Cardus (1968) (Fig. 20). Se transfirieron 4 ml. de cada muestra de plasma u orina a los reservorios de los frascos de microdestilación. Se cerraron estos con los conos utilizando grasa siliconada de vacío para asegurar la hermeticidad, y fueron conectados por el brazo lateral, utilizando tubo de goma reforzado para vacío, a la bomba de vacío.

Cuando la evacuación era completa, (usualmente se mantuvo el vacío durante 30 segundos a -600 mm Hg), la conexión fue

cerrada mediante una llave de doble entrada, y se colocó hielo seco triturado en el interior del cono, comenzando a depositarse el agua evaporada de las muestras de plasma u orina en la superficie interna fría del cono en forma de cristales.

Cuando el hielo seco se evaporaba totalmente, estos cristales se fundían, goteando el agua del depósito interior del frasco o cámara de recogida.

Este ciclo fué generalmente repetido una segunda vez, suministrando unos 0,5 ml. de agua destilada, de los que se tomaban alicuotas duplicadas de 0,2 ml. que eran transferidas a los viales de contaje conteniendo 10 ml. de mezcla de centelleo.

5.3.1. Prueba de fraccionamiento isotópico durante la microdestilación en vacío

En tres frascos volumétricos fueron colocados 40 ml de agua destilada, 40 ml. de plasma de rata, obtenido por exsanguinación de 5 animales, y 40 ml. de orina humana. Los tres fueron marcados con agua tritiada de referencia a una actividad específica final de 1×10^6 Dpm / ml.

De cada frasco se tomaron 8 alicuotas de 4 ml. que fueron destiladas en vacío dos veces consecutivas según la técnica

ca que acabamos de describir.

Cuando la destilación fue completa se tomaron alicuotas duplicadas de 0,2 ml. del agua destilada contenida en la cámara de recogida de cada frasco y de la muestra (agua, plasma u orina) contenida en el reservorio.

Todas las alicuotas fueron transferidas a viales de conteo conteniendo 10 ml. de mezcla de centelleo y de White, y contadas durante 10 minutos en las condiciones usuales.

6. DETERMINACION DEL AGUA CORPORAL TOTAL EN HUMANOS.-

6.1. Preparación de las dosis inyectables de HTO

El contenido de una ampolla de agua tritiada inyectable (The Radiochemical C_{tr.}, Amersham, Actividad Específica 5 miliCurios / ml., Contenido 1 ml.) fué trnasferido a un frasco volumétrico de 100 ml. adicionando suero salino fisiológico esteril y libre de pirógenos hasta enrasar. La ampolla fué lavada varias veces con suero salino para asegurar una recuperación máxima de laradioactividad.

A continuación, siguiendo las normas de BRINER (1963) sobre la preparación de productos radioactivos para usos clínicos se transfirieron con una jeringuilla hipodérmica esterilizada con un filtro Millipore acoplado (Tipo Swinny, No. Cat.SXGSO130S), 10 ml. de la solución preparada (Actividad

específica 50 microCurios / ml.) a un vial de vidrio esterilizado de 25 ml. de capacidad, cerrando este a continuación con un tapón de goma perforable asegurado con un sello metálico.

Las jeringuillas, pipetas y resto del material utilizado había sido esterilizado previamente.

Los viales de vidrio estériles nos fueron proporcionados por el Instituto de Farmacología Española.

De cada lote de 10 viales así preparados se tomó una pequeña alicuota de dos de ellos elegidos al azar para realizar un control bacteriológico.

6.2. Determinaciones de agua corporal en humanos

La determinación comenzaba en las primeras horas de la mañana, encontrándose los sujetos en ayunas, extrayéndoles una muestra de sangre, marcada con el número cero que servía como blanco para determinación de la Radioactividad de Fondo.

Asimismo, se pedía a cada sujeto que vaciase su vejiga urinaria, apartando una alicuota de la orina emitida (orina cero) para utilizarla como blanco.

A continuación se inyectaron a cada sujeto por vía intravenosa 10 ml. de Agua Tritiada en suero salino fisiológico, es

teril y libre de pirogenos con una actividad específica de 50 microCurios / ml.

Tras inyectar el agua tritiada se lavó dos veces la jeringuilla aspirando sangre venosa al interior y reinyectándola para minimizar la radioactividad residual.

La aguja fué entonces retirada de la vena y la mezcla de agua y sangre residual lavada dos veces con alicuotas de 2 ml. de agua. La solución de lavado se colocó en un tubo de ensayo graduado, registrando su volumen exacto.

Las muestras de sangre (10 ml. para asegurar suficiente cantidad de plasma para la destilación) fueron tomadas a los 2,8, 24 y 48 horas tras la inyección. Cada muestra fué heparinizada y centrifugada durante 20 minutos a 3000 rpm, separando el plasma para su posterior destilación.

Una hora después de la inyección de agua tritiada, el sujeto vació su vejiga urinaria; el volumen de orina recogida fue medido y anotado, separando una alicuota para la destilación y descartando el resto.

La segunda toma de orina fue realizada, siguiendo esa misma pauta, a las dos horas tras la inyección, iniciando inmediatamente después colecciones continuas de orina hasta las 12 horas tras la inyección, de las 12 a las 24 horas y de las 24 a las 48 horas.

Intercaladas entre estas colecciones continuas se recogieron tres muestras adicionales de la orina eliminada en intervalos de media hora centrados en las 12, 24, y 48 horas.

Se midió y anotó el volumen de cada muestra, separando una alicuota y descartando el resto.

Las alicuotas de plasma y orina fueron guardadas en tubos de ensayo bien cerrados, y conservados bajo refrigeración hasta la terminación del experimento. Todas las muestras procedentes de una misma determinación fueron procesadas al mismo tiempo.

Las muestras fueron destiladas en forma descrita y las alicuotas de 0,2 ml. de mezcla de centelleo de White durante 10 minutos en el contador TRI-CARB 314 AX determinando la eficiencia de conteo por el método de cociente de canales.

Con cada grupo de muestras procedentes de una misma determinación, se contó un standard de la Actividad inyectada, obtenido preparando una dilución 1:4000 V:V del agua tritida inyectada. Asimismo se determinó la Actividad Residual en la jeringuilla de inyección contando una alicuota del agua de lavado de la jeringuilla tras haber sido destilada en forma igual a las muestras de plasma y orina.

6.3. Determinación del Peso Corporal Magro

Antes de comenzar la prueba, los sujetos, en ayunas, y vestidos con un traje de baño fueron pesados en una balanza con un error de apreciación no superior a ± 50 gr., midiéndose además su talla descalzos.

El Porcentaje de Grasa Corporal determinó a partir de la ecuación de Rathbun y Pace (1945):

$$\% \text{ Grasa Corporal} = \frac{5.548}{\text{Grav. Especifica}} = 5.004$$

Calculando la Gravedad Especifica por la Fórmula de Cowgill (1957)

$$\text{Gravedad Especifica} = 0,8 \frac{\text{Talla (cm)} \ 0,242}{\text{Peso (g)} \ 0,1} + 0,162$$

Con el Porcentaje de Grasa Corporal se calculó el Peso Corporal Magro a partir de la fórmula

$$\text{Peso Corporal Magro} = \text{Peso Corporal} - \frac{(\text{P. Corporal } \% \text{ Grasa Corporal})}{100}$$

Los cálculos fueron realizados en la calculadora Programma 602.

6.4. Estudio de la cinética de distribución del agua tritiada en el gato

Se utilizaron gatos de ambos sexos y pesos comprendidos entre 2 y 4 kg.

Los animales fueron anestesiados con Nembutal a una dosis de 40 mg/kg de peso. A continuación se les colocó un cateter en la vena femoral derecha por el que se les infundió solución salina fisiológica al 9 ‰ a un ritmo de 6 gotas/minuto, equivalente a 30 ml/hora, con objeto de acelerar el recambio acuoso orgánico y estimular la diuresis. La solución salina se mantuvo a una temperatura oscilante entre 34 y 36° C mediante un baño termostático.

Dos horas después de iniciar el goteo se les inyectó a través de otro cateter colocado en la vena femoral izquierda una dosis de 3 ml de Agua Tritiada esteril con una actividad total de 150 C.

Las muestras de orina fueron recogidas a través de una sonda vesical. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena femoral izquierda y fueron heparinizadas y centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de L.C.R. se recogieron por punción de la cisterna magna, insertando la aguja en el primer espacio intervertebral

cervical tras fijar el craneo del animal en una plataforma estereotáxica.

Los tiempos de recogida de las muestras de sangre y orina fueron usualmente cada 10 minutos durante la primera media hora tras la inyección, cada 15 minutos en la segunda media hora, y cada 30 minutos en las horas siguientes. Las muestras de L.C.R. se extrajeron cada 30 minutos.

Uno de los experimentos se realizó en un perro de 18 kg de peso al que se le inyectó una dosis de 10 ml de HTO con Actividad Total de 500 microCurios. La metodología experimental fué la misma excepto en que a la solución salina para la infusión intravenosa se le añadieron 5 cc de Edemox Wasserman, un diurético inhibidor de la carbónico anhidrasa, por cada 250 ml de solución.

El pH de las muestras de orina fué determinado en un pH-metro Metrohm-Herisau E-369 B.

APENDICE A

PROGRAMA PARA EL CALCULO EN EL PROGRAMMA 602 DE LA
ACTIVIDAD ABSOLUTA (DPM) DETERMINANDO LA EFICIENCIA
DE CONTAJE POR STANDARDIZACION EXTERNA.-

$$y = ax^2 - bx - c$$

y = Eficiencia de conteaje

x = Cociente de Canales para el Standard Externo

a,b,c,: Coeficientes de la curva

Ajuste por mínimos cuadrados:

$$"c" = \frac{[(\sum x^3)^2 - \sum x^4 \sum x^2][\sum y \sum x^2 - \sum xy \sum x] + [\sum x^3 \sum x^2 y - \sum xy \sum x^3][(\sum x^2)^2 - \sum x^3 \sum x]}{[(\sum x^3)^2 - \sum x^4 \sum x]^2 - [(\sum x)^2 - n \sum x^2][(\sum x^3)^2 - \sum x^4 \sum x^2]}$$

$$"a" = \frac{[\sum y \sum x^2 - \sum xy \sum x] + c[(\sum x)^2 - n \sum x^2]}{(\sum x^2)^2 - \sum x^3 \sum x}$$

$$"b" = \frac{\sum xy - a \sum x^3 - c \sum x}{\sum x^2}$$

1. /- Inactivación Desviador M
2. S Registro del Tiempo de Contaje
3. RS
4. D↑ Memorización del Tiempo en el registro RD
5. S Registro del Nº de Contajes
6. BS
7. D↑ Memorización en BD

8. S Registro de las Dpm / 100 del Standard de Tritio
9. RS
10. D/↑ Memorización en el registro RD/
11. S Registro de los Dpm / 100 de los Standards de Apa
gamiento
12. BS
13. D/↑ Memorización en BD/
14. S Registro de la Radioactividad de Fondo en Canal I
15. RS
16. C/↑ Memorización en el registro RC/
17. S Registro de la Radioactividad de Fondo en Canal II
18. BS
19. C/↑ Memorización en el registro BC/
20. R/◇ Interlinea
21. A/Z Destino Salto Incondicionado : Comienzo del ciclo
de cálculo de Eficiencias y Cocientes de Canales
de los Standards
22. S Registro de Cuentas Observadas Canal II (Canal
Analizador)
23. ↓ Transferencia al registro A
24. S Registro de Cuentas Observadas Canal II, (29 Conta
je)
25. + Suma de los dos contajes
26. RS
27. D÷ División por el Tiempo
28. BS
29. D÷ División por nº de Contajes = Cpm observadas
30. BS
31. C/- Cpm - Fondo = Cpm netas en Canal Analizador



- 32. B/ \updownarrow Transferencia al registro B/ de las Cpm netas
- 33. S Registro Cpm en Canal I sin Standard Externo
- 34. RS
- 35. E \uparrow Memorización en el registro RE
- 36. S Registro Cpm en el Canal II sin S.E.
- 37. RS
- 38. E/ \updownarrow Memorización en el registro RE/
- 39. S Registro Cpm en Canal I con Standard Externo
- 40. \downarrow Transferencia al registro A (Registro Operativo)
- 41. RS
- 42. E- Cpm I con SE - Cpm I sin SE
- 43. RS
- 44. C/- Cpm I con SE - Cpm sin SE - Fondo canal I
- 45. RS
- 46. E \updownarrow Transferencia al registro RE
- 47. S Registro Cpm en Canal II con Standard Externo
- 48. \downarrow Transferencia al registro A
- 49. RS
- 50. E/- Cpm II con SE - Cpm II sin SE
- 51. BS
- 52. C/- Cpm II con SE - Cpm II sin SE - Fondo Canal II
- 53. RS
- 54. E \div Division por el contenido del registro RE
- 55. R/ \div Interlinea
- 56. A \diamond Impresión del Cociente de Canales para el Stan_
dard Externo
- 57. CV Salto a subprograma C/ $\sqrt{}$ (Obtención de Sumatorios
de "x")

- 58. /S Sondeo del Desviador M
- 59. AV Origen de Salto Condicionado a la Actividad del Desviador M
- 60. B/↓ Transferencia del contenido del registro B/ (Cpm netas) al registro A
- 61. RS
- 62. D/⌘ $\text{Cpm netas} / \text{Dpm Std} - H^3 / 100 = \text{Eficiencia de Contaje para el Standard de Tritio}$
- 63. R/⌘ Interlinea
- 64. A⌘ Impresión de la Eficiencia para el Standard de Tritio
- 65. D/√ Salto al Subprograma D/√ (Obtención Sumatorios de "Y")
- 66. /+ Activación del Desviador M
- 67. AZ Destino de Salto Incondicionado (Inicia de nuevo el ciclo de cálculo de Eficiencia y Cociente de Canales para el Standard Externo)
- 68. A/V Destino de Salto Condicionado a la activación del Desviador M
- 69. B/↓ Transferencia del contenido del registro B/ (Cpm netas) al registro A
- 70. BS
- 71. D/⌘ $\text{Cpm netas} / \text{Dpm Standards Apagamiento} / 100 = \text{Eficiencia de contaje para los standards de Apagamiento}$
- 72. R/⌘ Interlinea
- 73. A⌘ Impresión de las Eficiencias para los Standards de Apagamiento

- 74. $D\checkmark$ Salto al Subprograma $D\checkmark$ (Obtención Sumatorios de "Y")
- 75. AZ Destino de Salto Incondicionado
- 76. R/\checkmark Interlinea
- 77. C/\checkmark Subprograma para obtención de Sumatorios de "x" (cocientes de Canales para el Standard Externo)
- 78. $B\updownarrow$ Memorización del contenido del registro A (Cociente de Canales o "x") en B
- 79. $B\downarrow$ Transferencia de "X" al registro A
- 80. $C+$ Suma con el contenido del registro C : $\sum x$
- 81. $C\updownarrow$ Memorización de $\sum x$ en el registro C
- 82. $B\downarrow$ Transferencia de "x" al registro A
- 83. AX Obtención de x^2
- 84. F/\checkmark Memorización de x^2 en el registro F/
- 85. F/\downarrow Transferencia de x^2 al registro A
- 86. $C/+$ Suma con el contenido del registro C/ : $\sum x^2$
- 87. C/\updownarrow Memorización de $\sum x^2$ en el registro C/
- 88. $B\downarrow$ Transferencia de X al registro A
- 89. AX Obtención de x^2
- 90. X Obtención de x^3
- 91. $D+$ Suma con el contenido del registro D: $\sum x^3$
- 92. $D\updownarrow$ Memorización de $\sum x^3$ en el registro D
- 93. $B\downarrow$ Transferencia de X al registro A
- 94. AX Obtención de x^2
- 95. AX Obtención de x^4
- 96. $D/+$ Suma con el contenido del registro D/ : $\sum x^4$
- 97. D/\updownarrow Memorización de $\sum x^4$ en el registro D/

98. C/ \checkmark Fin del Subprograma C/ \checkmark
99. D/ \checkmark Subprograma para obtención de Sumatorios de "Y" (Eficiencias de Contaje)
100. B/ \uparrow Memorización del contenido de A (Eficiencias de contaje o "Y" en B/
101. B/ \downarrow Transferencia de "Y" al registro A
102. E+ Suma con el contenido del registro E= $\sum Y$
103. E \uparrow Memorización de $\sum Y$ en el registro E
104. B/ \downarrow Transferencia de "Y" al registro A
105. BX Multiplicación por contenido del registro B=XY
106. E/+ Suma con el contenido del registro E/ = $\sum XY$
107. E/ \uparrow Memorización de $\sum XY$ en el registro E/
108. B/ \downarrow Transferencia de Y al registro A
109. F/X Multiplicación por contenido del registro F/ = $X^2 \cdot Y$
110. F+ Suma con el contenido del registro F = $\sum X^2 Y$
111. F \uparrow Memorización de $\sum X^2 Y$ en el registro F
112. RS
113. C \downarrow Transferencia del contenido del registro RC (Nº de puntos) a A
114. A \uparrow
115. D/ \downarrow Nº 1 Codificado
116. + Adición de una unidad al contenido del registro RC
117. RS
118. C \uparrow Memorización del Nº de puntos en el registro RC
119. R/ \downarrow Interlineas
120. D/ \checkmark Fin del subprograma D/ \checkmark

2º LADO

121.	BS	
122.	C/*	Aceramiento del registro BC/
123.	BS	
124.	D*	Aceramiento del registro BD
125.	BS	
126.	D/*	Aceramiento del registro BD/
127.	D↓	Transferencia de $\sum X^4$ al recinto A
128.	C/X	Multiplicación por $\sum X^2 = \sum X^4 \sum X^2$
129.	D↕	Memorización de $\sum X^4 \sum X^2$ en el registro D/
130.	D↓	Transferencia de $\sum X^3$ al recinto A
131.	AX	Obtención de $(\sum X^3)^2$
132.	D/-	$(\sum X^3)^2 - \sum X^4 \sum X^2$
133.	D↕	Memorización de $(\sum X^3)^2 - \sum X^4 \sum X^2$ en el registro D/
134.	C↓	Transferencia de $\sum X^2$ al registro A
135.	RS	
136.	CX	Multiplicación por el Nº de puntos = n X^2
137.	B↕	Memorización de $n \sum X^2$ en el registro B
138.	C↓	Transferencia de $\sum X$ al registro A
139.	AX	Obtención de $(\sum X)^2$
140.	B-	$(\sum X)^2 - n \sum X^2$
141.	RS	
142.	C↕	Memorización de $(\sum X)^2 - n \sum X^2$ en el recinto RC/
143.	C↓	Transferencia de $\sum X$ al recinto A

144. DX Multiplicación por $\sum X^3 = \sum X^3 \sum X$
145. B \updownarrow Memorización de $\sum X^3 \sum X$ en el registro B
146. C C \downarrow Transferencia de $\sum X^2$ al registro A
147. AX Obtención de $(\sum X^2)^2$
148. B- $(\sum X^2)^2 - \sum X^3 \sum X$
149. RS
150. D \updownarrow Memorización de $(\sum X^2)^2 - \sum X^3 \sum X$ en el registro D
151. C \downarrow Transferencia de $\sum X$ al registro A
152. E/X Multiplicación por $\sum XY = \sum XY \sum X$
153. B \updownarrow Memorización de $\sum XY \sum X$ en el registro B
154. C \downarrow Transferencia de $\sum X^2$ al registro A
155. EX Multiplicación por $\sum Y = \sum X^2 \sum Y$
156. B- $\sum X^2 \sum Y - \sum XY \sum X$
157. RS
158. D \updownarrow Memorización de $\sum X^2 \sum Y - \sum XY \sum X$ en el registro RD/
159. D \downarrow Transferencia de $\sum X^3$ a A
160. E/X Multiplicación por $\sum XY = \sum X^3 \sum XY$
161. B \updownarrow Memorización de $\sum X^3 \sum XY$ en el registro B
162. C \downarrow Transferencia de $\sum X^2$ al registro A
163. FX Multiplicación por $\sum X^2 Y = \sum X^2 \sum X^2 Y$
164. B- $\sum X^2 \sum X^2 Y - \sum X^3 \sum XY$
165. E \updownarrow Memorización de $\sum X^2 \sum X^2 Y - \sum X^3 \sum XY$ en el registro E
166. RS
167. C \downarrow Transferencia de $(\sum X)^2 - n \sum X^2$ a Registro A

168. D/X Multiplicación por $(\sum X^3)^2 - \sum X^4 \sum X^2$
169. B↕ Memorización del producto en registro B
170. RS
171. D↓ Transferencia de $(\sum X^2)^2 - \sum X^3 \sum X$ a registro A
172. AX $[(\sum X^2)^2 - \sum X^3 \sum X]^2$
173. B- Resta del contenido del registro B en el Registro
174. B↕ Memorización del resultado en el Registro B
175. RS
176. D↓ Transferencia de $\sum Y \sum X^2 - \sum XY \sum X$ al registro A
177. D/X Multiplicación por $(\sum X^3)^2 - \sum X^4 \sum X^2$
178. B↕ Memorización del producto en el Registro B/
179. E↓ Transferencia de $\sum X^2 \sum X^2 Y - \sum XY \sum X^3$ al registro A
180. RS
181. DX Multiplicación por $(\sum X^2)^2 - \sum X^3 \sum X$
182. B/+ Suma con el contenido del registro B/
183. B÷ División por el contenido del registro B
184. R/◇ Interlinea
185. A◇ Impresión del coeficiente "C"
186. D/↕ Memorización de "c" en el Registro D/
187. D/↓ Transferencia de "c" a Registro A
188. RS
189. C/X Multiplicación por $(\sum X)^2 - n \sum X^2$
190. RS
191. D/+ Suma de $\sum Y \sum X^2 - \sum XY \sum X$ al producto anterior
192. RS

193. | D÷ División por el contenido del registro RD
194. R/ Interlinea
195. A◇ Impresión del coeficiente "a"
196. E↕ Memorización en el registro E del coeficiente "a"
197. D/↓ Transferencia de "c" al registro A
198. CX Multiplicación por $\sum X = c \sum X$
199. C↕ Memorización de $c \sum X$ en el registro C
200. E↓ Transferencia de "a" al registro A
201. DX Multiplicación por $\sum X^3 = a \sum X^3$
202. C+ Suma con el contenido del registro C = $a \sum X^3 + c \sum X$
203. C↕ Memorización de $a \sum X^3 - c \sum X$ en el registro C
204. E/↓ Transferencia de $\sum XY$ al registro A
205. C- $\sum XY - a \sum X^3 - c \sum X$
206. C/÷ División por el contenido del registro C/
207. R/◇
208. A◇ Impresión del coeficiente "b"
209. R/◇ Interlinea
210. E/↕ Memorización de "b" en el registro E/
211. /Y Destino de Salto Incondicionado de origen externo (Comienzo cálculo de Dpm de las muestras)
212. R/◇ Interlinea
213. S Registro del tiempo de conteo de las muestras
214. D↑ Memorización del tiempo en el registro D
215. S Registro de la Radioactividad de Fondo en Canal I.
216. C↑ Memorización en el registro C

217. S Registro de la radioactividad de Fondo en Canal II
218. C/↑ Memorización en el Registro C/
219. R/◇ Interlinea
220. R/◇ Interlinea
221. A/V Destino de Salto Incondicionado: Inicia un ciclo para el cálculo de la Eficiencia y Dpm de cada muestra
222. S Registro del Nº de Muestra
223. S Cuentas observadas en Canal II (Analizador)
224. ↓ Transferencia al Registro A
225. S Cuentas observadas en Canal II, 2º Contaje
226. + Suma con las cuentas del primer contaje
227. | A↑
228. | D/↑ Nº 2 codificado
229. ÷ Cuentas medias observadas en Canal I
230. D÷ Division por el tiempo = Cpm en Canal II
231. C/- Cpm - Fondo = Cpm en Canal II
232. B↕ Memorización de Cpm netas en el Registro B
233. R/◇ Interlinea
234. S Registro de Cpm en Canal I sin Standard Externo
235. F↑ Memorización en el registro F
236. S Registro de Cpm en Canal II sin Standard Externo
237. F/↑ Memorización en el recinto F/
238. S Registro de Cpm en Canal I con Standard Externo

239. ↓ Transferencia al registro A
240. F- Cpm I con SE - Cpm I sin SE
241. C- Cpm I con SE - Cpm I sin SE Fondo E
242. F↑ Memorización en el Registro F
243. S Registro de Cpm en Canal II con Standard Ex_ternos
244. ↓ Transferencia al Registro A
245. F/- Cpm II con SE - Cpm II sin SE
246. C/- Cpm II con SE - Cpm II sin SE Fondo II
247. F÷ División por el contenido del registro F = Co_ciente de Canales para el Standard Externo
248. F⬆ Memorización del Cociente de Canales (X) en el registro F
249. F↓ Transferencia del cociente de Canales (X) al registro A
250. E/X Multiplicación por el contenido del registro E/ (b) = b X
251. F/⬆ Memorización de bX en el Registro F/
252. F↓ Transferencia de X al Registro A
253. AX Obtención de X^2
254. EX Multiplicación por el contenido de E (a) = aX^2
255. F/+ $aX^2 - bX$
256. D/+ $aX^2 - bX - c = Y =$ Eficiencia de Contaje para la Muestra
257. R/⬆ Interlinea
258. A⬆ Impresión de la Eficiencia de contaje para la muestra
259. B/⬆ Memorización de la Eficiencia en el Registro B/

260. B↓ Transferencia de las Cpm netas al registro B
261. A↑
262. DS
263. RS
264. R↓ Nº 100 Codificado
265. X Cpm netas 100
266. B/s División por la Eficiencia
267. R/◇ Interlinea
268. A◇ Impresión de la Actividad Absoluta de la Muestra
269. R/◇ Interlinea
270. R/◇ Interlinea
271. AV Destino de Salto Incondicionado: Inicia el ci
clo para la muestra siguiente
272. /V Fin de Lectura de Programa

PROGRAMA PARA EL CALCULO EN EL PROGRAMMA 602 DE LAS
ACTIVIDADES ABSOLUTAS (DPM) DETERMINANDO LA EFICIENCIA
DE CONTAJE POR EL METODO DEL COCIENTE DE CANALES.-

$$y = a - bx$$

y = Eficiencia de Contaje

x = Coeficiente de Canales

a = Ordenada en el origen

b = Pendiente de la recta

Ajuste por mínimos cuadrados.-

$$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{n}$$

$$r = (n \sum xy - \sum x \sum y) / \sqrt{(n \sum x^2 - (\sum x)^2) \cdot (n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$$

1. /- Inactividad del Desviador M
2. A/* Aceramiento de la primera parte de la Memoria
3. S Registro del Tiempo de Contaje
4. RS
5. C/↑ Memorización del Tiempo en el registro RC/
6. S Registro del número de contajes
7. BS
8. C/↑ Memorización del número de contajes en el
registro BC/

9. S Registro de las Dpm / 100 del Standard de Tritio
10. RS
11. D↑ Memorización en el registro BD
12. S Registro de las Dpm/ 100 de los Standards de Apagamiento
13. BS
14. D↑ Memorización en el registro BD
15. S Registro de la Radioactividad de Fondo en el Canal I
16. RS
17. D/↑ Memorización en el registro RD/
18. S Registro de la Radioactividad de Fondo en el Canal II
19. BS
20. D/↑ Memorización en el registro BD/
21. A/Z Destino de Salto Incondicionado (Inicia el ciclo de cálculo de las Eficiencias y Cocientes de Canales de los Standards)
22. R/◇ Interlinea
23. S Registro de las Cuentas observadas en el canal II (Analizador)
24. ↓ Transferencia al registro A
25. S Registro de las Cuentas observadas en el Canal II, (2º Contaje)
26. + Suma de los dos Contajes
27. RS
28. C/÷ División por el Tiempo

- 29. BS
- 30. C/₂ División por el Número de Contajes
- 31. BS
- 32. D/- Cpm Canal I - Fondo Canal I = Cpm netas Canal I
- 33. E/₂ Memorización de las Cpm netas Canal II en el re_ gistro E/
- 34. R/₂ Interlinea
- 35. S Registro de las Cuentas observadas en el Canal I
- 36. ↓ Transferencia al Registro A
- 37. RS
- 38. C/₂ División por el Tiempo
- 39. RS
- 40. D/- Cpm Canal I - Fondo Canal I = Cpm netas Canal I
- 41. B/₂ Memorización de las Cpm netas Canal I en el re_ gistro B
- 42. S Registro de las Cuentas observadas en el Canal II
- 43. ↓ Transferencia al registro A
- 44. RS
- 45. C/₂ División por el Tiempo
- 46. BS
- 47. D/- Cpm Canal II - Fondo Canal II = Cpm netas Canal II
- 48. B/₂ Memorización de las Cpm netas canal II en el re_ gistro B/
- 49. B↓ Transferencia del contenido del registro B/ (Cpm netas canal I) al registro A

- 50. B/ ϕ División por el contenido del registro B/ (Cpm netas Canal II)
- 51. R/ ϕ Interlinea
- 52. A ϕ Impresión de los Cocientes de Canales
- 53. D $\sqrt{}$ Salto al subprograma D/ $\sqrt{}$ (obtención de sumatorio de "x")
- 54. /S Sondeo del Desviador M
- 55. AV Origen del salto condicionado a la activación del desviador
- 56. E/ \downarrow Transferencia del contenido del registro E/ (Cpm netas Canal II al registro A
- 57. RS
- 58. D \div Cpm netas Canal II / Dpm Std. H^3 / 100
- 59. R/ ϕ Interlinea
- 60. A ϕ Impresión de la Eficiencia de Contaje para el Standard de Tritio
- 61. E $\sqrt{}$ Salto al Subprograma E/ $\sqrt{}$ (obtención de Sumatorios de "Y")
- 62. /+ Activación del desviador M
- 63. AZ Origen de salto Incondicionado
- 64. A/V Destino de Salto condicionado a la activación del Desviador M
- 65. E/ \downarrow Transferencia de las Cpm netas Canal II al registro A
- 66. BS
- 67. D \div Cpm netas Canal II / Dpm Stds. Apagamiento /100

68. R/◇ Interlinea
69. A◇ Impresión de las Eficiencias de Contaje para los Standards de Apagamiento
70. EV Salto al Subprograma E/√ (obtención de sumatorios de "Y")
71. AZ Origen de Salto Incondicionado
72. /Z Destino de Salto Incondicionado de Origen Externo (Inicia el cálculo de los parámetros de la recta de regresión)
73. C↓ Transferencia del contenido del registro C ($\sum x$) al registro A
74. AX Obtención de $(\sum x)^2$
75. E↕ Memorización de $(\sum x)^2$ en el registro E
76. RS
77. C↓ Transferencia del contenido del registro RC (nº de Puntos) al registro A
78. C/X Multiplicación por $x^2 = n\sum x^2$
79. E- $n\sum x^2 - (\sum x)^2$
80. F↕ Memorización de $n\sum x^2 - (\sum x)^2$ en el registro F
81. C↓ Transferencia de $\sum x$ al registro A
82. DX Multiplicación por $\sum y = \sum x \sum y$
83. E↕ Memorización de $\sum x \sum y$ en el registro E
84. RS
85. C↓ Transferencia del Nº de puntos al registro A
86. D/X Multiplicación por $\sum xy = n\sum xy$
87. E- $n\sum xy - \sum x \sum y$
88. E/↕ Memorización de $n\sum xy - \sum x \sum y$ en el registro E/
89. E/↓ Transferencia de $n\sum xy - \sum x \sum y$ al registro A

90. $F \div$ División por el contenido del registro F
 $(n \sum x^2 - (\sum x)^2)$
91. R/\diamond Interlinea
92. $A \diamond$ Impresión del parámetro "b" o pendiente de la recta
93. C/\updownarrow Memorización de "b" en el registro C/
94. C/\downarrow Transferencia de "b" al registro A
95. CX Multiplicación por el contenido del registro C
 $(\sum x) = b \cdot \sum x$
96. $E \updownarrow$ Memorización de $b \sum x$ en el registro E
97. $D \downarrow$ Transferencia de $\sum y$ al registro A
98. E- $\sum y - b \sum x$
99. RS
100. $C \div$ División por el N° de puntos
101. $A \updownarrow$ Instrucciones que no afectan al programa. Reser
102. $A \updownarrow$ var espacio necesario para la adaptación del pro
103. $A \downarrow$ grama al cálculo de una recta de regresión cor_
 respondiente a una exponencial
104. R/\diamond Interlinea
105. $A \diamond$ Impresión del parámetro "a" (ordenada en el ori
 gen de la recta)
106. $D \downarrow$ Transferencia de y al registro A
107. AX Obtención de $(\sum y)^2$
108. $E \updownarrow$ Memorización de $(\sum y)^2$ en el registro E
109. RS
110. $C \downarrow$ Transferencia del N° de Puntos al registro A
111. F/X Multiplicación por $\sum y^2 = n \sum y^2$
112. E- $n \sum y^2 - (\sum y)^2$

113. FX Multiplicación por $n\sum x^2 - (\sum x)^2$
114. AV Obtención de la raíz cuadrada del producto
115. E↕ Memorización de la raíz cuadrada en el registro E
116. E↙ Transferencia del contenido del registro E/
117. $(n\sum xy - \sum x \sum y)$ al registro A
117. E÷ División por el contenido del registro E
118. R/△ Interlinea
119. A◇ Impresión de "r" (Coeficiente de Correlación líneal de Spearman)
120. RS
121. C* Aceramiento del registro RC
122. V Vuelta a la Primera Instrucción del Programa
123. D/√ Subprograma para obtención de sumatorios de "x"
124. E↕ Memorización del Cociente de Canales ("x") en el registro E
125. E↓ Transferencia de x al registro A
126. C+ Suma con el contenido del registro C = x
127. C↕ Memorización de $\sum x$ en el registro C
128. E↓ Transferencia de x al registro A
129. AX Obtención de x^2
130. C/+ Suma con el contenido del registro C/= $\sum x^2$
131. C/↕ Memorización de $\sum x^2$ en el registro C/
132. D/√ Fin del Subprograma D/√
133. E/√ Subprograma para la obtención de sumatorios de "y"
134. A↕ Instrucciones sin efecto. Permiten la corrección necesaria para el

135. $\bar{A} \downarrow$ ajuste de una exponencial
136. $E \downarrow$ Memorización de la Eficiencia ("y") en el registro E/
137. $E \downarrow$ Transferencia de Y al registro A
138. AX Obtención de y^2
139. $F/+$ Suma con el contenido del registro F/ $= \sum y^2$
140. $F \downarrow$ Memorización de $\sum y^2$ en el registro F/
141. $E \downarrow$ Transferencia de Y al registro A/
142. $D+$ Suma con el contenido del registro D $= \sum y$
143. $D \downarrow$ Memorización de $\sum y$ en el registro D
144. $E \downarrow$ Transferencia de Y al registro A
145. EX Multiplicación por x $= x \cdot y$
146. $D/+$ Suma con el contenido del registro D/ $= \sum xy$
147. $D \downarrow$ Memorización de $\sum xy$ en el registro D/
148. RS
149. $C \downarrow$ Transferencia del contenido del registro RC (Nº de Puntos) al registro A
150. $A \uparrow$
151. $D \downarrow$ Nº 1 codificado
152. $+$ Adición de una unidad al Nº de puntos
153. RS
154. $C \downarrow$ Memorización de Número de Puntos en el registro RC
155. $E \downarrow$ Fin del subprograma E/

SEGUNDO LADO

156. S Registro del parámetro "b"
157. $C \uparrow$ Memorización de "b" en el registro C

158. S Registro del parámetro "a"
159. C/↑ Memorización de "a" en el registro C/
160. /Y Destino de Salto Incondicionado de origen externo (Para poder cambiar Tiempos o Fondos durante el cálculo de muestras)
161. S Registro del tiempo de conteo de la muestra
162. B↑ Memorización en el registro B
163. S Registro del Nº de Contajes
164. AS
165. B↑ Memorización en el registro AB
166. S Registro de la Radioactividad de Fondo en el Canal I
167. B/↑ Memorización en el registro B/
168. S Registro de la Radioactividad de
169. AS
170. B/↑ Memorización en el registro AB/
171. /Z Destino de Salto Incondicionado (Inicia el ciclo de cálculo de Eficiencias y Dpm para cada muestra)
172. R/◇ Interlinea
173. S Registro del Nº de Muestras
174. R/◇ Interlinea
175. S Registro de las cuentas observadas en el Canal
176. II (Canal Analizador)
176. ↓ Transferencia al registro A
177. S Registro de las cuentas observadas en el Canal
177. II (2º Contaje)

- 178. \downarrow Suma de los dos contajes
- 179. $B \div$ División por el Tiempo
- 180. AS
- 181. $B \div$ División por el N° de Contajes
- 182. AS
- 183. $B/-$ Cpm Canal II - Fondo Canal II = Cpm netas
Canal II
- 184. $D \updownarrow$ Memorización de las Cpm netas Canal II en el
registro D
- 185. R/\diamond Interlinea
- 186. S Registro de las Cuentas observadas en el Canal
I
- 187. \downarrow Transferencia al registro A
- 188. $B \div$ División por el Tiempo
- 189. $B/-$ Cpm Canal I - Fondo Canal I = Cpm netas Canal I
- 190. D/\diamond Memorización de Cpm netas Canal I en el registro
D/
- 191. S Registro de las Cuentas observadas en el Canal
II
- 192. \downarrow Transferencia al registro A
- 193. $B \div$ División por el Tiempo
- 194. AS
- 195. $B/-$ Cpm Canal II - Fondo Canal II = Cpm netas Canal
II
- 196. $E \updownarrow$ Memorización en el registro E
- 197. D/\downarrow Transferencia de Cpm netas Canal I al registro
A
- 198. $E \div$ División por las Cpm netas Canal II

- 199. C \times Multiplicación por "b" = b . x
- 200. C/+ Suma del contenido del registro C/ (a) = a + bx
- 201. R/◇ Interlinea
- 202. A◇ Impresión de la Eficiencia de Contaje para la muestra
- 203. E/↗ Memorización de la Eficiencia en el registro E/
- 204. D↓ Transferencia de las Cpm netas Canal II al registro A
- 205. A↑
- 206. DS
- 207. RS
- 208. R/↘ Nº 100 Codificado
- 209. X Cpm netas Canal II x 100
- 210. E/↖ División por la Eficiencia
- 211. R/◇ Interlinea
- 212. A◇ Impresión de la Actividad (Dpm) de la Muestra
- 213. R/◇ Interlinea
- 214. Z Destino de Salto Incondicionado (Para iniciar el ciclo para otra muestra)

El programa puede adaptarse para el ajuste de una exponencial del tipo

$$Y = a \cdot e^{-bx}$$

$$\ln y = \ln a - bx$$

Sustituyendo las instrucciones

134. Δ

135. Δ

por estas otras

134. $/\ast$

135. AY Obtención del logaritmo natural de "Y"

Si se desea la impresión del parámetro "a", en lugar del "Ln a", habrá además que sustituir

101. Δ

102. Δ

103. Δ

por

101. $/\ast$

102. AZ Obtención del Autologaritmo del contenido del registro A (Ln a)

103. A/X Naturalización del resultado

CAPITULO QUINTO.-

RESULTADOS.-

COMENTARIO A LOS RESULTADOS

1. ELECCION DE LAS CONDICIONES DE CONTAJE Y DETERMINACION DE LA EFICIENCIA

La Figura 21 muestra la selección de las condiciones de conteaje en relación con el alto voltaje aplicado a los fototubos y la amplitud de ventana. Las condiciones elegidas fueron: Alto Voltaje 3-750 = Aproximadamente 875 Voltios, Amplitud de Ventana 100-1000, que proporcionaron una cifra de mérito de 36.

Las Figuras 22 y 23 son ejemplos de la aplicación de nuestro programa (Apéndice B) para ajustar la relación Eficiencia/Cociente de Canales a la ecuación:

$$\text{Eficiencia} = A \cdot e^{-K \cdot \text{Cociente de Canales}}$$
 , para el contador Tri-Carb 314-AX, y a la ecuación:

$$\text{Eficiencia} = A - K \cdot \text{Cociente de Canales},$$
 para el contador Mark-II.

La Figura 24 es otro ejemplo del ajuste de la relación Eficiencia/Cociente de Canales para el Standard Externo a una ecuación cuadrática, utilizando nuestro programe (Apéndice A).

En la Figura 25 se observa la relación Eficiencia/Cociente de Canales para los Standards de Apagamiento Químico preparados con Agua y Piridina. Coincidieron con la curva obtenida con los Standards de Apagamiento suministrados por Packard Instruments Co. excepto en los Standards de Apagamiento más intenso, en los que se obtuvo una relación más lineal con la Piridina.

2. MEZCLAS DE CENTELLEO

La Tabla 8 muestra los resultados obtenidos en la prueba de Solubilización de la orina en la Mezcla de Centelleo de Butler. El criterio seguido para estimar solubilización incompleta, fué la apreciación a simple vista de una separación en dos fases de la orina y la Mezcla. Los volúmenes máximos de orina con los que se consiguió una solubilización completa fueron 0.2, 0.5 y 1 ml. para 10, 15 y 20 ml de Mezcla respectivamente.

Las Figuras 26, 27 y 28 muestran el efecto de la variación en las concentraciones de PPO, dimetil-POPOP y Naf-taleno sobre la Eficiencia de Contaje proporcionada por una Mezcla de Centelleo. Sobre los resultados obtenidos se eligió como óptima una concentración de PPO de 8gr./litro, puesto que concentraciones mayores no incrementaron perceptiblemente la Eficiencia de la Mezcla, aunque sí

su coste. Atendiendo a los mismos criterios, se seleccionaron las concentraciones de 0.6 gr./litro para el dimetil-POPOP y 150 gr./litro para el Naftaleno.

3. PREPARACION DE MUESTRAS

La Tabla 9 muestra los resultados obtenidos con la Mezcla de Butler y distintos métodos de preparación de muestras de Plasma: A: Ninguna preparación, B: Precipitación con la Mezcla y Filtrado, C: Igual pero con volumen de muestra menor, D: Precipitación con metanol y E: Precipitación con Acido TricloroAcético. Se representan los valores de Cociente de Canales como un Índice del grado de Apagamiento. La Eficiencia se determinó por la fórmula

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Cpm Netas}}{\text{Dpm Contenido}} \times 100$$

La Cifra de Mérito usada fué de la forma propuesta por White (1968)

$$\text{C.d.m.} = (\text{Cps/microCurio H}^3) \times \% \text{Agua}$$

La mejor Eficiencia, a pesar de su apagamiento más alto, se obtuvo con la precipitación con Acido Tricloroacético.

Sin embargo, la diferencia con la Eficiencia obtenida sin ningun tipo de preparación, no fué estadísticamente significativa.

En la Tabla 10 pueden verse los resultados obtenidos con la Mezcla de Centelleo de Butler sobre muestras de orina, sin preparación previa y con decoloración por Carbón Activado. Al igual que en el caso anterior, la diferencia entre las Eficiencias de Contaje obtenida no fué significativa.

La Tabla 11 muestra los resultados obtenidos en la prueba de fraccionamiento isotópico durante la microdestilación en vacío, presentados en forma de Actividad Absoluta en Dpm tras corregir para las distintas Eficiencias de Contaje obtenidas con el Agua, el Plasma y la Orina.

Solo en el caso del agua fué apreciable una mayor actividad en la muestra original que en el agua destilada, aunque en los tres tipos de muestras las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En la Tabla 12 se comparan las Eficiencias de Contaje obtenidas con varias Mezclas de Centelleo para muestras de pequeño volumen de Líquidos Biológicos, utilizando dos volúmenes de Mezcla: 10 y 15 ml.

La Eficiencia más alta fué proporcionada por la Mezcla de Centelleo Y de White. Las diferencias encontradas al usar 10 ó 15 ml de Mezcla de Centelleo no fueron suficientemente grandes para justificar el incremento de un 33% en el coste.

Al comparar los resultados obtenidos al contar pequeños volúmenes de Plasma y Orina sin preparación previa, y alícuotas iguales del agua obtenida por destilación en vacío a partir de los mismos Plasma y Orina, utilizando en ambos casos la Mezcla de Centelleo Y de White, encontramos una eficiencia ligeramente menor para el agua destilada, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

4. DETERMINACIONES DEL VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL EN HUMANOS

La Tabla 14 resume las características antropométricas de los sujetos experimentales que más interés tienen para nuestro estudio.

Las Figuras 29 a 38, ambas inclusive, muestran la evolución de la concentración del Agua Tritiada Inyectada (expresada como el logaritmo natural de la Actividad Específica de Tritio) en relación con el tiempo transcurrido tras la inyección, en los 10 sujetos.

Al ajustar los puntos obtenidos en la representación gráfica de nuestros datos a la ecuación de una recta de la forma:

$$\ln A(t) = \ln A_0 - Kt$$

siendo

$A(t)$ = Actividad Específica de Tritio a un tiempo "t"

A_0 = Ordenada en el origen de la recta

K = Pendiente de la recta

encontramos que A_0 (es decir, la Actividad Específica de Tritio extrapolada al momento de la inyección) fué mayor para la Orina que para el Plasma en todos los sujetos.

Asímismo, la pendiente de la recta, K , fué mayor en la Orina que en el Plasma en todos los casos estudiados.

Así pues, durante el periodo inicial de las determinaciones, la Actividad Específica de Tritio fué mayor en las muestras de Orina que en las de Plasma, aunque esta diferencia fué disminuyendo al avanzar el tiempo.

En los sujetos ESB, FJE, APF y PLA (figs. 35 a 38), el punto de cruce de ambas rectas estuvo dentro de las 48 horas de duración del experimento, siendo pues menor la

Actividad Específica de Tritio en Orina que la de Plasma durante el tiempo restante.

En cada figura se han anotado las Ecuaciones Exponenciales que describen el comportamiento del Agua tritiada en la Orina y el Plasma, así como los Coeficientes de Correlación Lineal de Spearman respectivos.

En la Tabla 15 se resumen estas diferencias en la evolución del trazador, comparando los valores de las Ordenadas en el Origen y las Pendientes de las Rectas de Regresión para la Orina y el Plasma en los 10 sujetos.

Aunque, teniendo en cuenta las considerables variaciones individuales, cualquier conclusión obtenida de una comparación de las medias de estos valores no tiene mucha significación, la diferencia entre los valores medios de K para la Orina y el Plasma fué significativa a un nivel de probabilidad $p < 0.01$.

La Tabla 16 muestra el efecto de estas diferencias sobre las estimaciones del Volumen de Agua Corporal Total realizadas a partir de la Actividad de Tritio en Orina y en Plasma.

Los volúmenes de distribución del Agua Tritiada estimados a partir del Plasma (Valor Medio 45.1 litros) fueron mayores que los estimados a partir de la Orina (Valor Medio 42.0 litros) aunque la diferencia entre sus promedios no

fué estadísticamente significativa.

Los tiempos de Vida Media Biológica del HTO estimados a partir del Plasma (Valor Medio 14.7 días) fueron tambien mayores que los estimados a partir de la Orina (Valor Medio 8.3 días) siendo la diferencia entre estos valores medios significativa a un nivel de probabilidad $p < 0.025$.

En la Tabla 16 se expresan tambien los Volúmenes de Agua Corporal Total como porcentaje del Peso Corporal Magro, con un valor medio de 67.6% para las estimaciones sobre Orina y de 72.5% para las de Plasma

5. CINETICA DEL AGUA TRITIADA EN PLASMA Y ORINA EN EL GATO

Las Figuras 39,40,41 y 42 muestran la evolución de la Actividad Específica de Tritio (expresada en logaritmos naturales) en Plasma y Orina en relación al tiempo tras la inyección en gatos.

En todas ellas se ha determinado el último término exponencial por análisis gráfico, ajustando posteriormente los puntos a la ecuación de una recta por el método de los mínimos cuadrados.

Al igual que en los humanos, la Actividad Específica extra-

polada a tiempo cero y la Pendiente de la Recta, fué mayor en la Orina que en el Plasma en todos los casos.

El último término exponencial de la Curva de Actividad en Orina y en Plasma está expresado al pie de cada figura así como su Coeficiente de Correlación Lineal de Spearman.

La pendiente de ambas rectas fué mucho menor en el gato 4 que en los otros animales coincidiendo con una diuresis muy escasa. La necropsia posterior demostró un proceso avanzado de esclerosis bilateral renal.

Las Figuras 43,44,45 y 46 muestran la evolución del Agua Tritiada inyectada en Orina, Plasma y Líquido Céfalorraquídeo.

Se determinaron los parámetros del último término exponencial igual que en los casos anteriores para los tres compartimentos. En todos los casos la Actividad Específica de Tritio extrapolada a tiempo cero de la Orina siguió siendo mayor que la del Plasma, así como la pendiente de su recta.

La correspondiente al L.C.R. fué mayor que la del Plasma aunque menor que la de la Orina. Su pendiente se aproximó más al valor de la del Plasma que a la de la Orina.

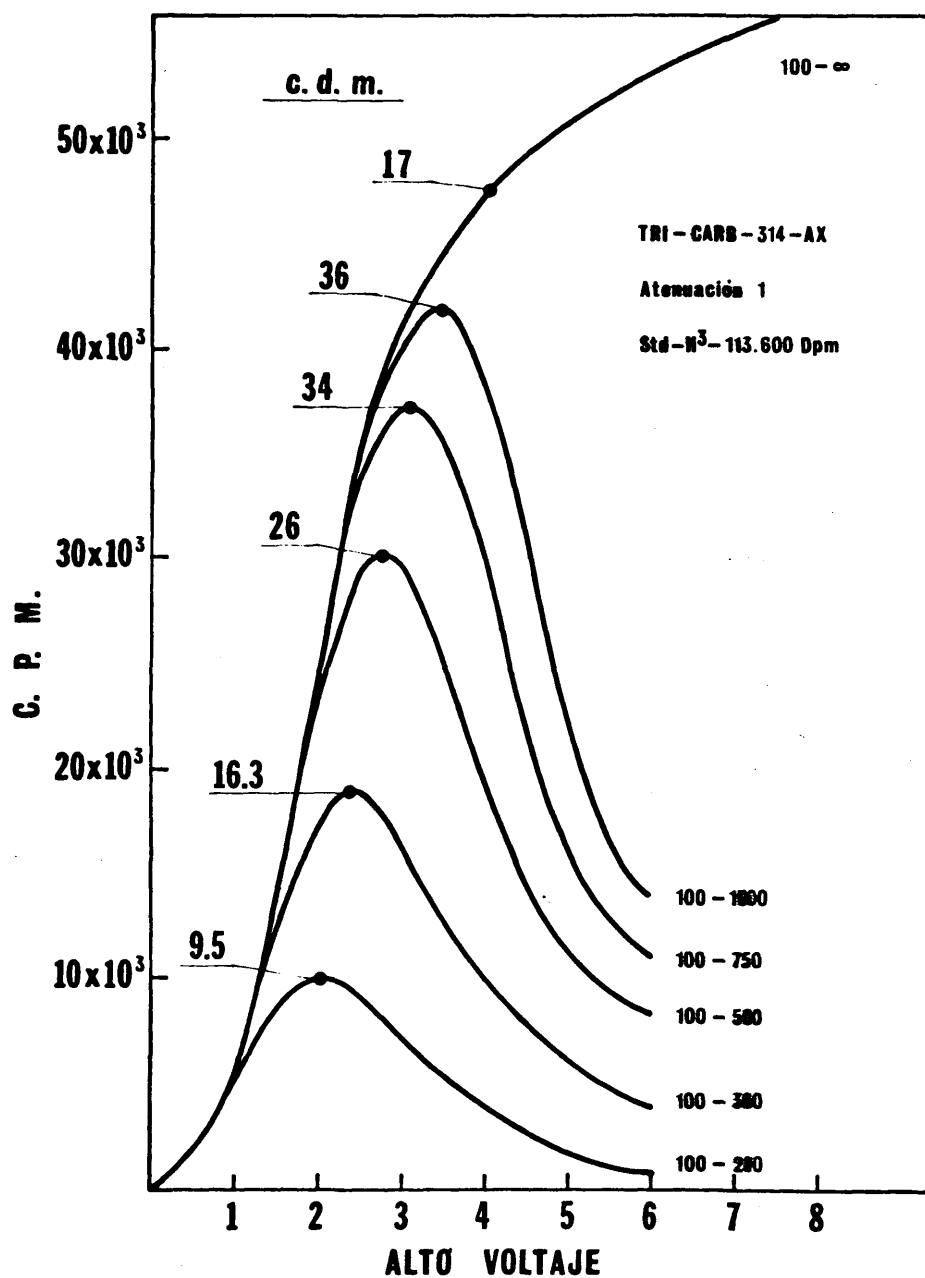
También en los cuatro animales el pico máximo de la Curva de Actividad en L.C.R. apareció más tarde que los de Orina y Plasma, entre 30 y 60 minutos tras la inyección.

La Tabla 17 resume las diferencias en las Actividades a tiempo cero y las Pendientes para Orina, Plasma y L.C.R. en los animales estudiados.

En la Figura 47 se representa la Cinética del Agua Tritiada en Plasma y Orina en un perro tratado con un diurético inhibidor de la Anhidrasa Carbónica. Los resultados fueron semejantes a los obtenidos en humanos y gatos.

FIGURA 21

EFFECTO DEL ALTO VOLTAJE APLICADO A LOS FOTOTUBOS
Y DE LA AMPLITUD DE VENTANA SOBRE LA CIFRA DE
MERITO PARA TRITIO.-



c.d.m. = cifra de mérito = E^2/F

FIGURA 22

RELACION ENTRE EFICIENCIA DE CONTAJE PARA TRITIO
Y COCIENTE DE CANALES EN EL CONTADOR TRI-CARB

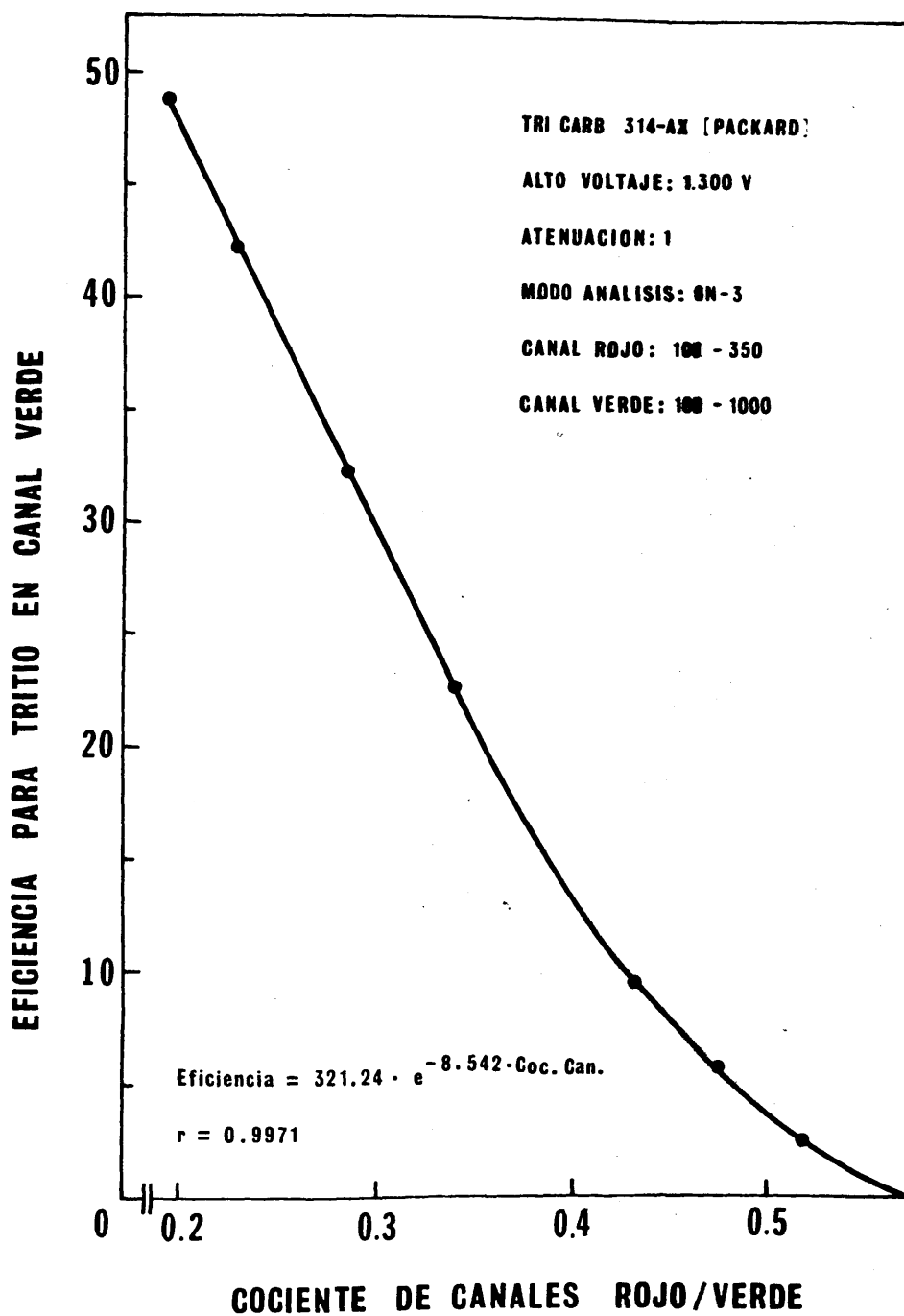


FIGURA 23

RELACION ENTRE EFICIENCIA DE CONTAJE PARA TRITIO
Y COCIENTE DE CANALES EN EL CONTADOR MARK II

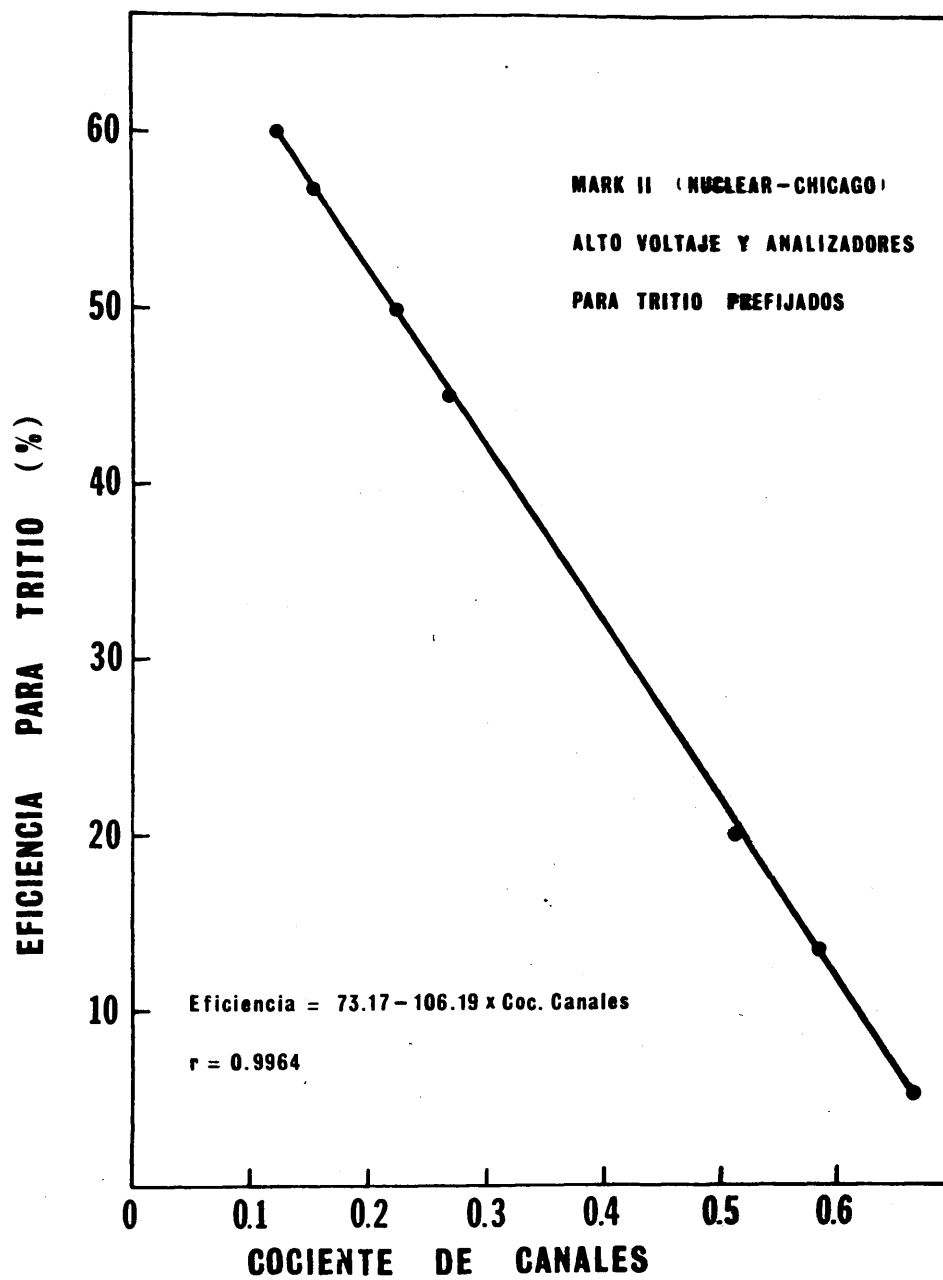


FIGURA 24

RELACION ENTRE EFICIENCIA DE CONTAJE PARA TRITIO Y
COCIENTE DE CANALES DEL STANDARD EXTERNO EN EL CONTADOR MARK II

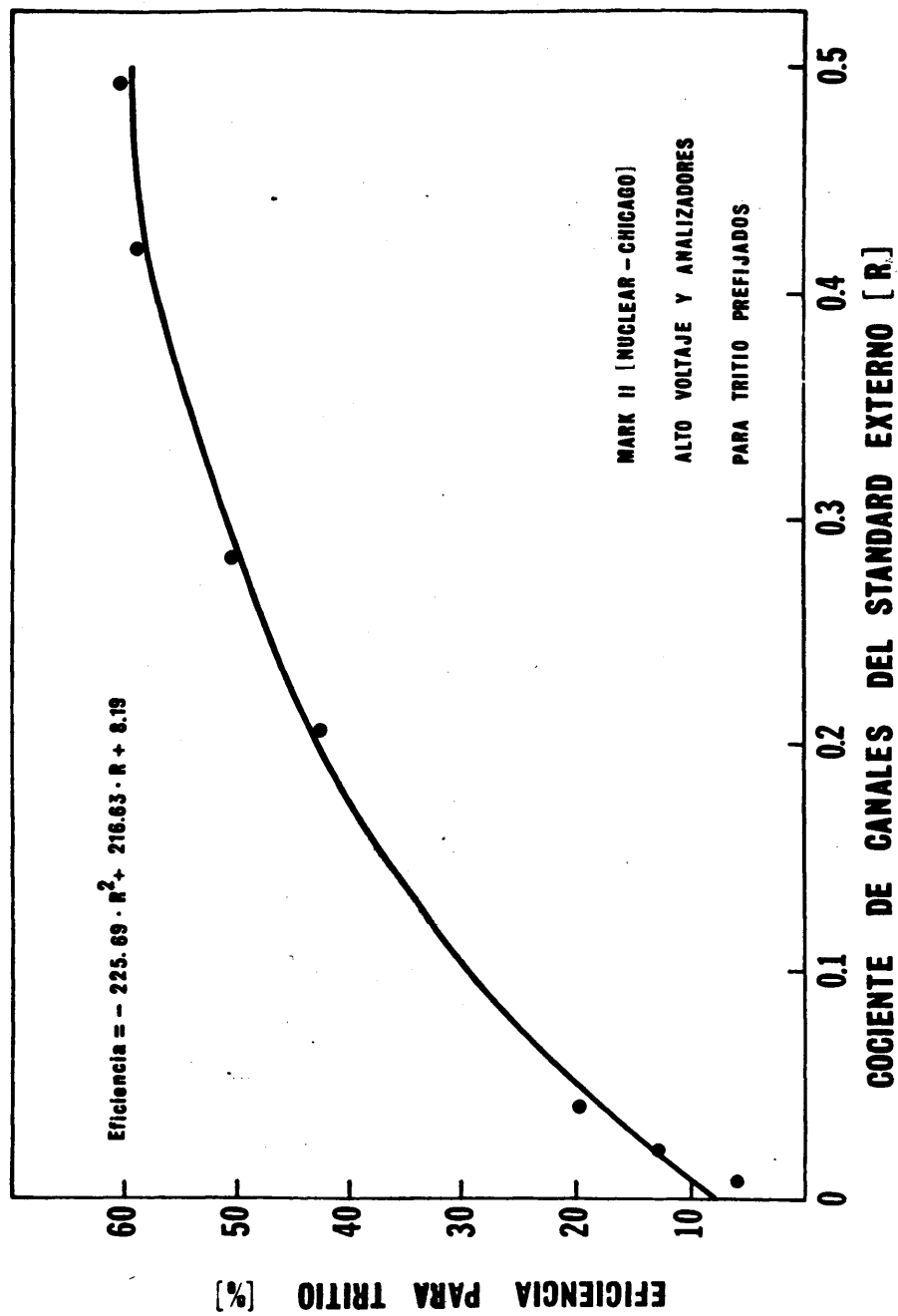


FIGURA 25

RELACION ENTRE EFICIENCIA DE CONTAJE PARA TRITIO Y
COCIENTE DE CANALES PARA LOS STANDARDS DE APAGAMIENTO
CON AGUA Y CON PIRIDINA

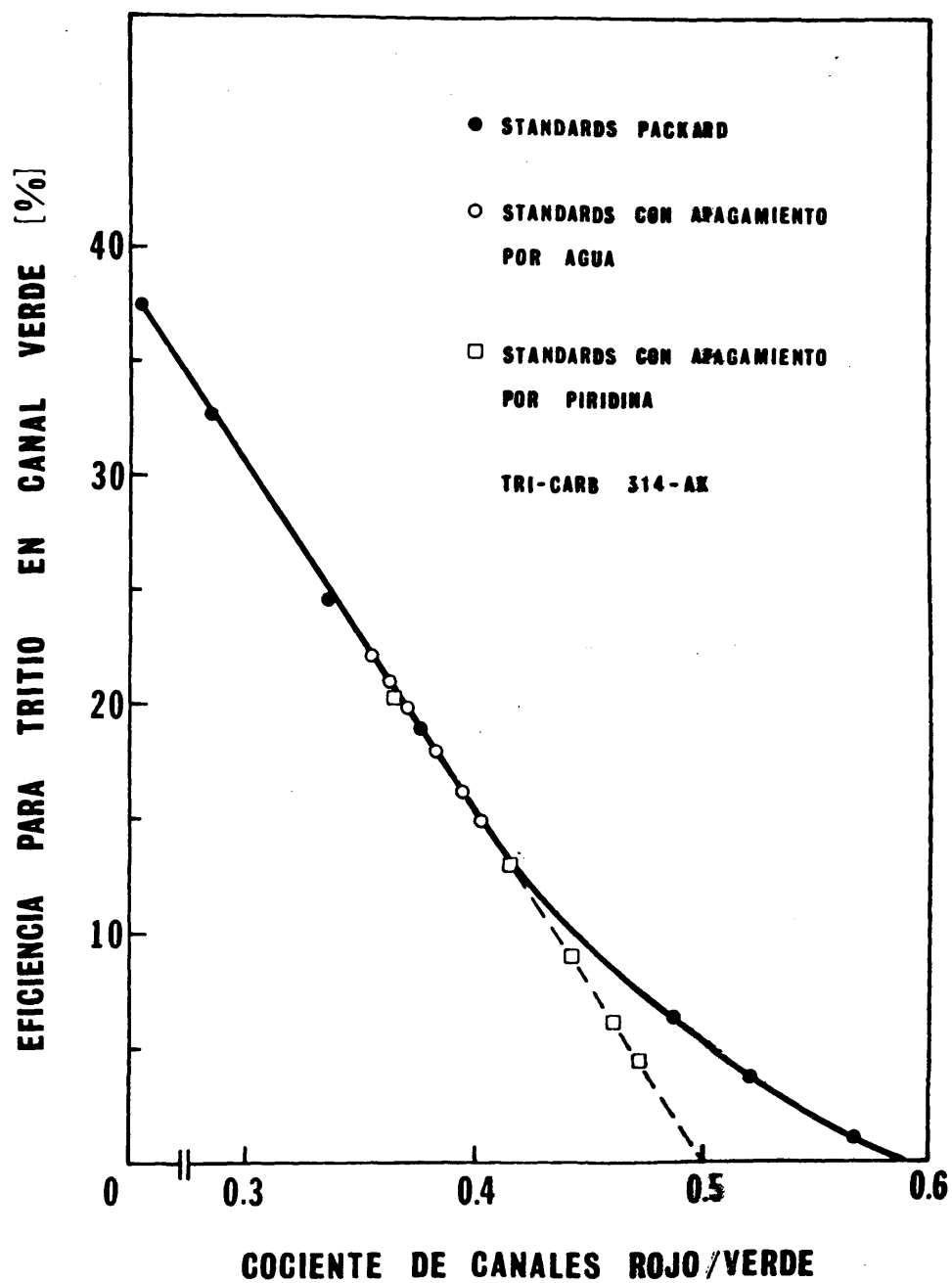


TABLA 8

SOLUBILIDAD DE LA ORINA EN LA MEZCLA DE CENTELLEO DE BUTLER

MEZCLA [ml]	ORINA [ml]					
	0.1	0.2	0.5	1	2	3
10	S	S	NS	NS	NS	NS
15	S	S	S	NS	NS	NS
20	S	S	S	S	NS	NS

S: Solubilización Completa

NS: Solubilización Incompleta. Separación de la orina y la mezcla en dos fases.

FIGURA 26

RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE PPO EN LA
MEZCLA DE CENTELLED Y LAS C.P.M. DE TRITIO

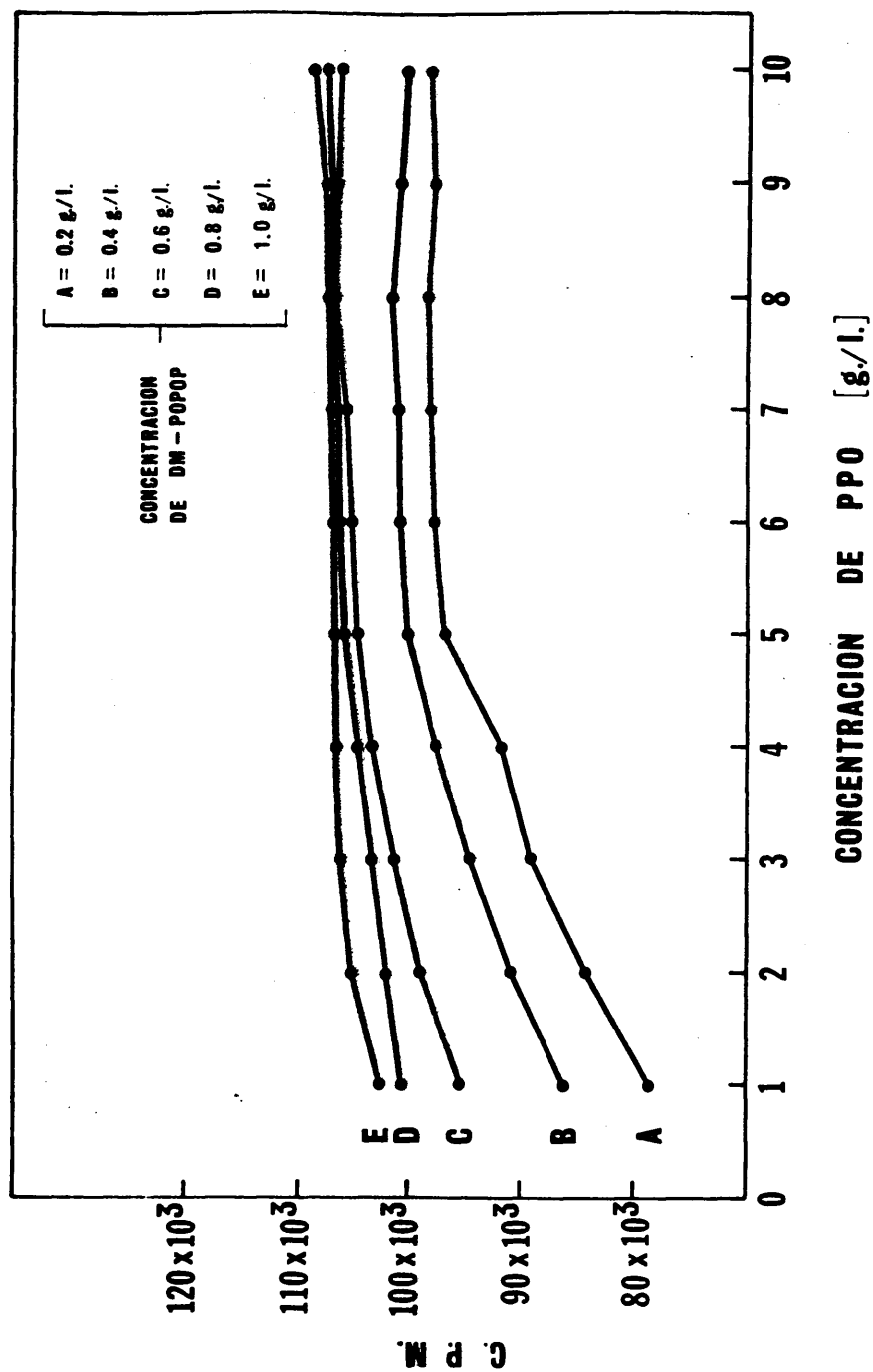


FIGURA 27

RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE DIMETIL-POPOP
EN LA MEZCLA DE CENTELLEO Y LAS C.P.M. DE TRITIO

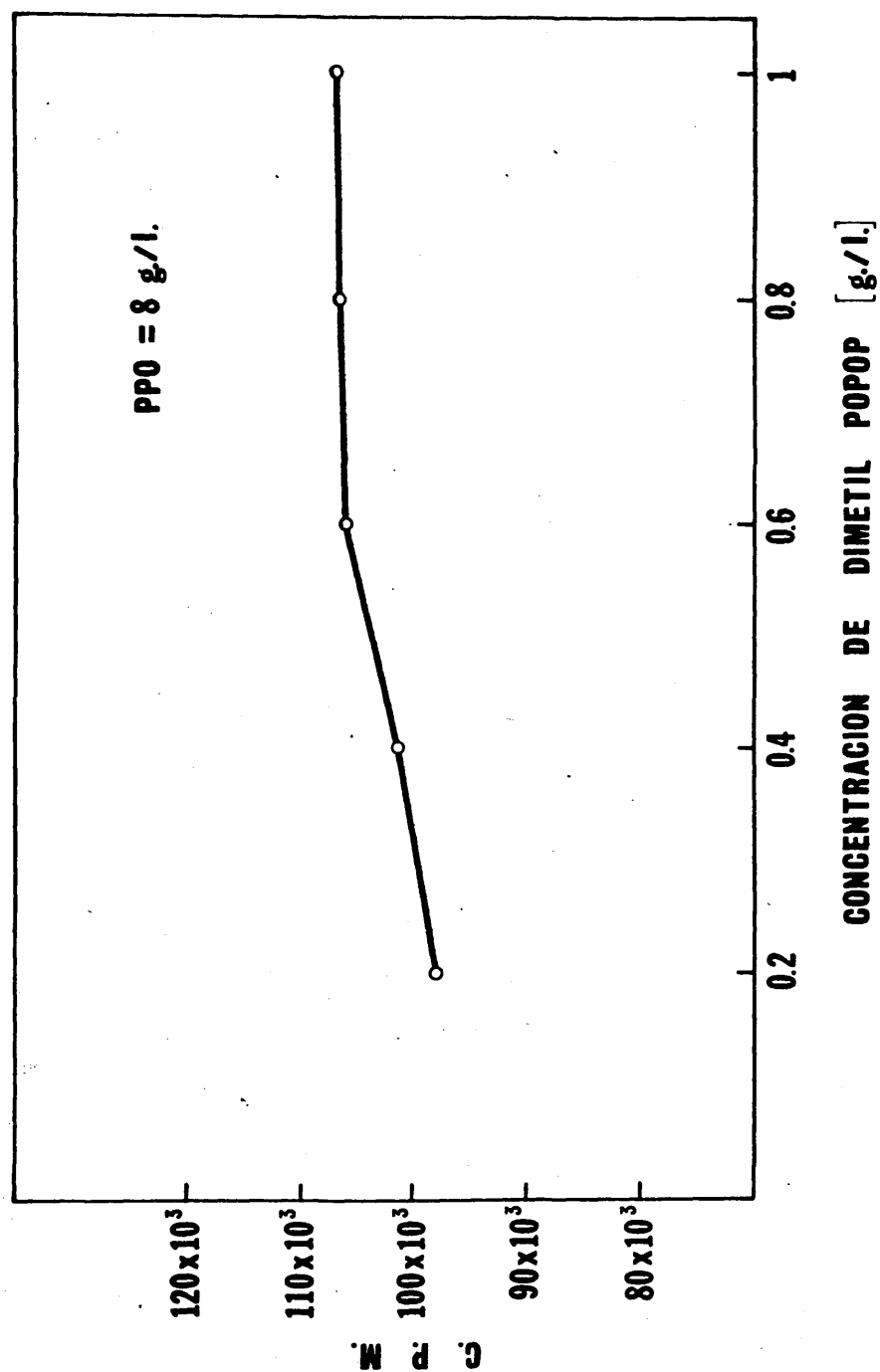


FIGURA 28

RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE NAFTALENO
EN LA MEZCLA DE CENTELLEO Y LAS C.P.M. DE TRITIO

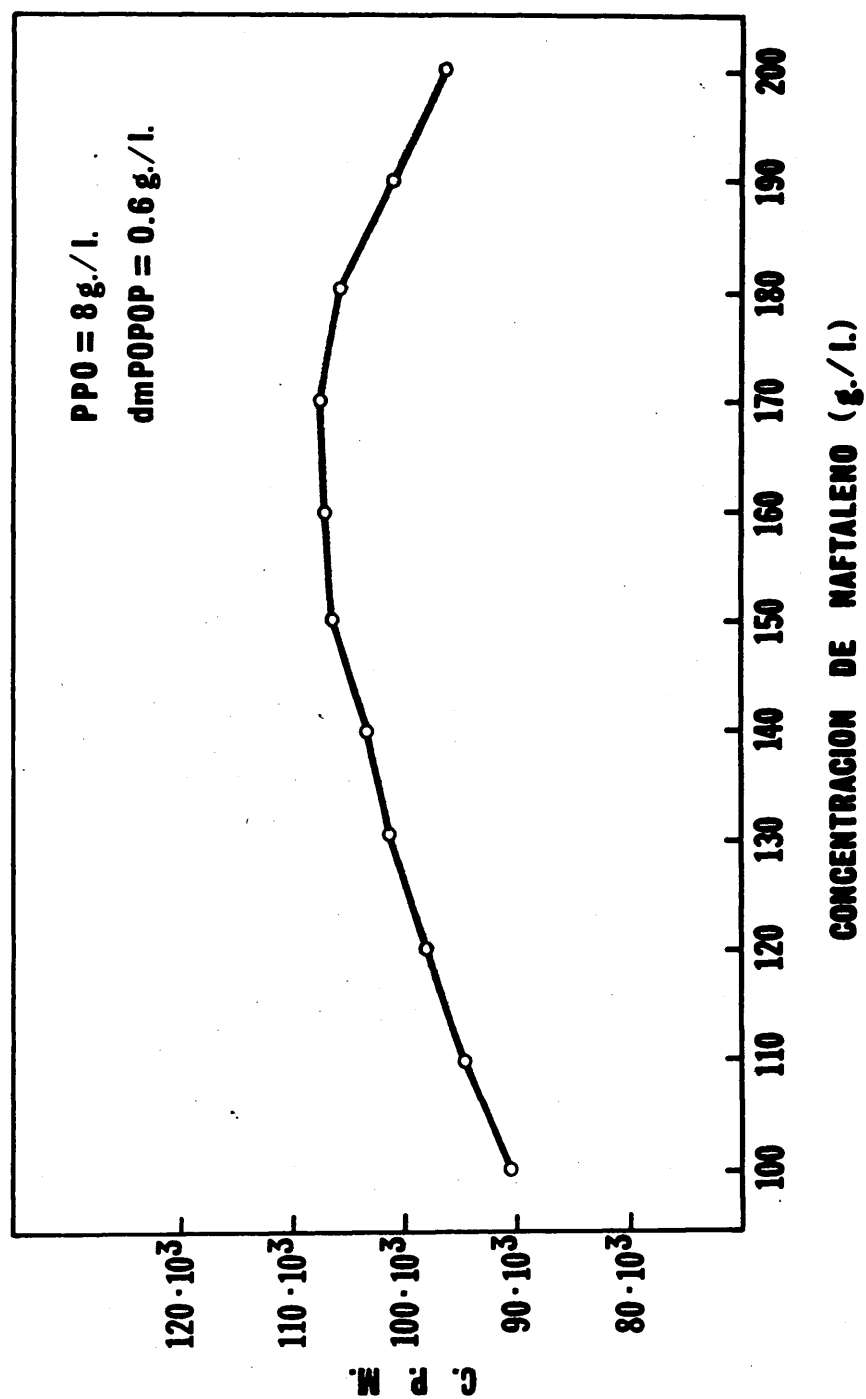


TABLA 9

PREPARACION DE MUESTRAS : PLASMA

METODO	C P M •	COCIENTE CANALES	EFICIENCIA	CIFRA DE MERITO
A	22.856 ± 128 [10]	0.273 ± 0.006	22.85 %	83.8×10^2
B	20.105 ± 141 [10]	0.261 ± 0.003	20.10 %	73.7×10^2
C	10.713 ± 63 [10]	0.258 ± 0.003	21.42 %	19.6×10^2
D	9.630 ± 76 [10]	0.293 ± 0.002	19.26 %	17.6×10^2
E	23.140 ± 136 [10]	0.280 ± 0.004	23.14 %	84.8×10^2

• Media \pm Desviacion Tipica

[10] Numero de casos

TABLA 10

PREPARACION DE MUESTRAS: ORINA

PREPARACION	C P M •	COCIENTE CANALES	EFICIENCIA	CIFRA DE MERITO
NO	20860 ± 156 [10]	0.269 ± 0.005	20.86 %	76.3 x 10 ²
DECOLORACION	22124 ± 143 [10]	0.253 ± 0.003	22.12 %	80.9 x 10 ²

• Media ± Desviación Típica

[10] Número de casos

TABLA 11

PRUEBA DE FRACCIONAMIENTO ISOTOPICO DURANTE LA DESTILACION EN VACIO

ACTIVIDAD DE TRITIO [Dpm] EN:

	AGUA	PLASMA	ORINA
AGUA DESTILADA	96.774 ± 431 [*] [8]	97.002 ± 681 [8]	96.859 ± 748 [8]
MUESTRA ORIGINAL	98.436 ± 635 [8]	97.891 ± 482 [8]	96.382 ± 585 [8]
P	N. S.	N. S.	N. S.

* Media ± Desviación Standard

[8] Número de casos

N. S.: No significativa

TABLA 12

COMPARACION DE LAS EFICIENCIAS DE CONTAJE OBTENIDAS
CON DIVERSAS MEZCLAS DE CENTELLEO PARA MUESTRAS BIOLOGICAS

MEZCLA	VOL MUESTRA VOL MEZCLA ●	PLASMA		ORINA	
		EFICIENCIA %	S.E.M. n = 8	EFICIENCIA %	S.E.M. n = 8
Y White	0.2 / 15	36.8	0.21	34.7	0.29
	0.2 / 10	33.2	0.22	33.2	0.38
Butler	0.2 / 15	32.1	0.30	35.0	0.37
	0.2 / 10	32.6	0.41	31.8	0.40
X White	0.2 / 15	30.3	0.23	26.5	0.44
	0.2 / 10	30.3	0.37	25.5	0.6
Instagel	0.2 / 10	28.6	0.45	28.2	0.65
Bray	0.2 / 15	25.4	0.61	21.3	0.32
	0.2 / 10	22.2	0.54	19.2	0.52

● vol. en ml.

TABLA 13

COMPARACION DE LAS EFICIENCIAS DE CONTAJE OBTENIDAS CON LA MEZCLA DE
CENTELLEO Y DE WHITE PARA MUESTRAS BIOLOGICAS CON Y SIN DESTILACION EN VACIO PREVIA

EFICIENCIAS DE CONTAJE

PLASMA ^a	H ₂ O DESTILADA ^a DEL PLASMA	"t" STUDENT	p < 0.05
33.21 ± 0.22 ● [8]	32.61 ± 0.58 [8]	0.8988	N. S.

ORINA ^a	H ₂ O DESTILADA ^a DE LA ORINA	"t" STUDENT	p < 0.05
33.24 ± 0.38 [8]	32.33 ± 0.43 [8]	1.4897	N. S.

a: 0.2 ml Muestra 10ml Mezcla Centelleo Y de White

● Media ± Error Standard de la Media

[8] Numero de Casos

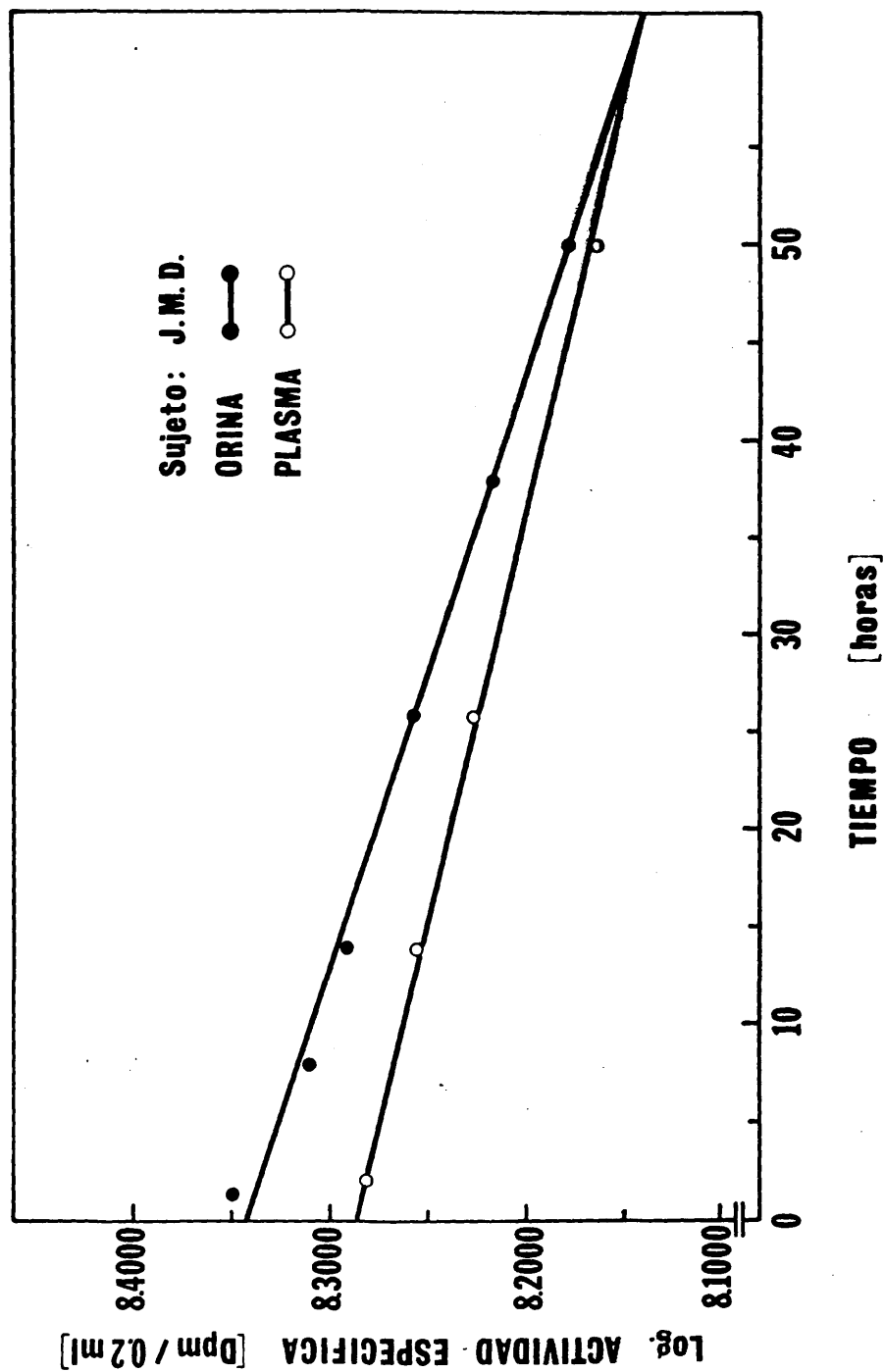
T A B L A 14

CARACTERISTICAS ANTROPOMETRICAS DE LOS SUJETOS

SUJETOS	EDAD *	TALLA**	PESO***	G. E.	% E. C.	P. C. M.***
J.M.D.	22	178	73.35	1.076	11.00	65.27
R.A.S.	23	165	63.20	1.073	12.52	55.28
J.S.C.	22	172	59.25	1.088	5.31	56.10
J.Y.P.	21	170	82.30	1.056	20.99	65.02
F.J.D.	21	181	67.10	1.088	5.36	63.50
J.M.R.	21	179	77.45	1.073	12.79	67.54
E.S.B.	21	174	70.85	1.075	11.89	62.42
F.J.E.	23	175	67.30	1.081	9.04	61.21
A.P.F.	20	164	59.73	1.077	10.69	53.34
P.L.A.	21	183	85.95	1.066	15.02	73.03
MEDIA	21.5	174	70.64	1.075	11.46	62.41
DESV. STD.	0.97	6.4	9.14	0.009	4.57	5.73

* En Años; ** En Centímetros; *** En Kilogramos.

FIGURA 29



$$-0.00256t$$

$$\text{Plasma: } A(t) = 3893 \cdot e^{-0.00256t}$$

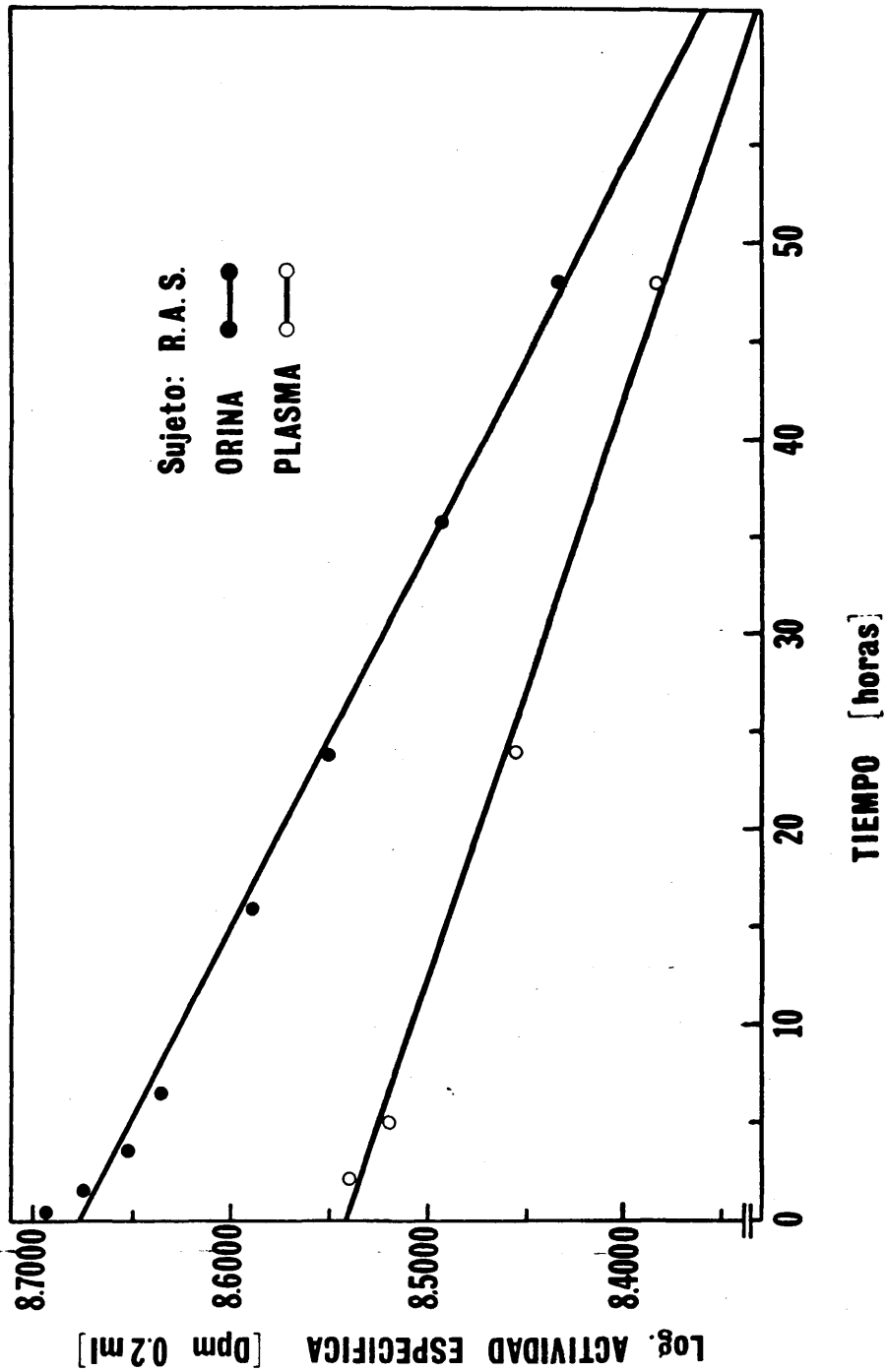
$$r = 0.9826$$

$$-0.00328t$$

$$\text{Orina: } A(t) = 4196 \cdot e^{-0.00328t}$$

$$r = 0.9508$$

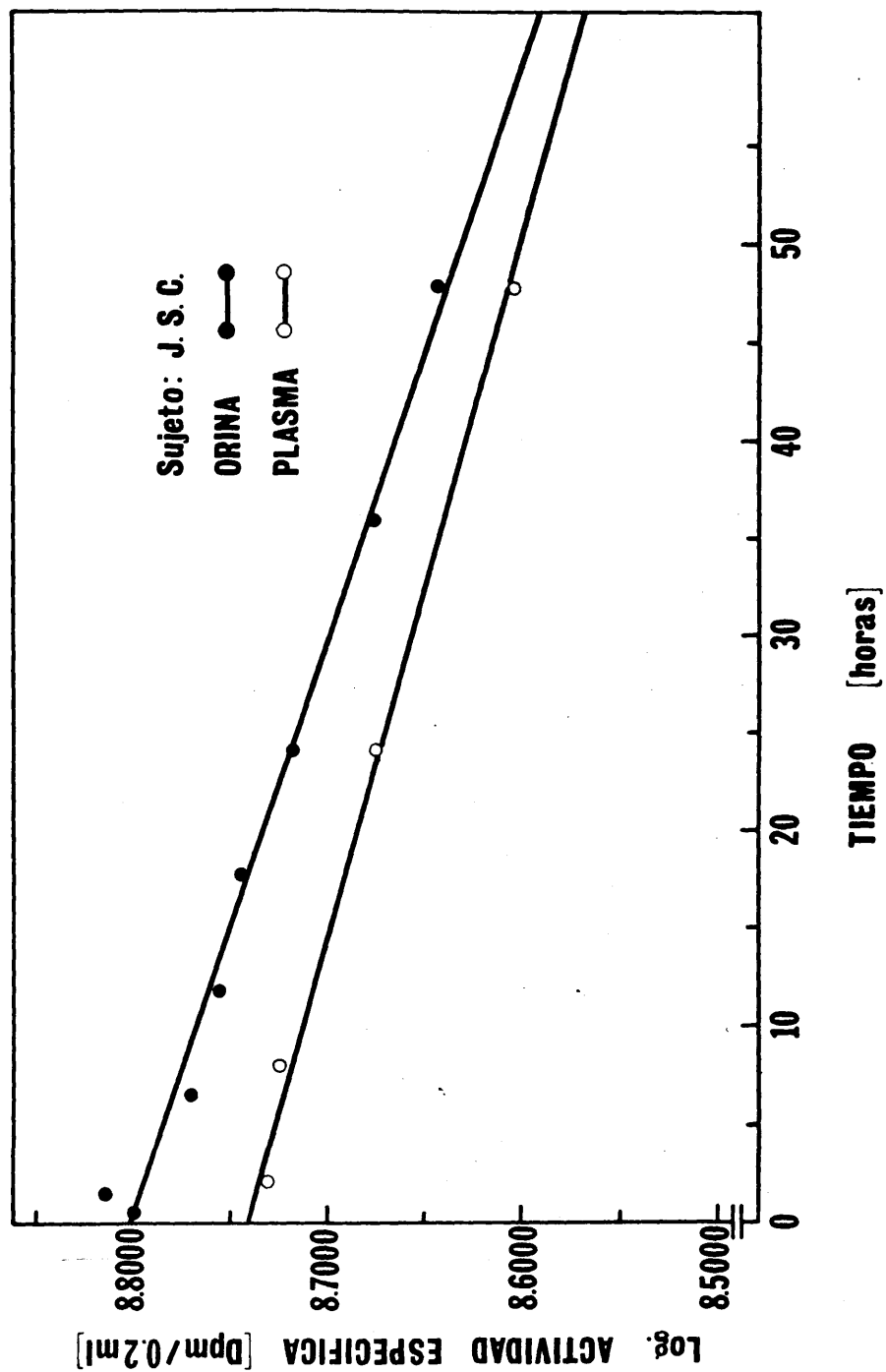
FIGURA 30



Orina: $A(t) = 5868 \cdot e^{-0.00517t}$
 $x = 0.9299$

Plasma: $A(t) = 5121 \cdot e^{-0.00339t}$
 $x = 0.9365$

FIGURA 31

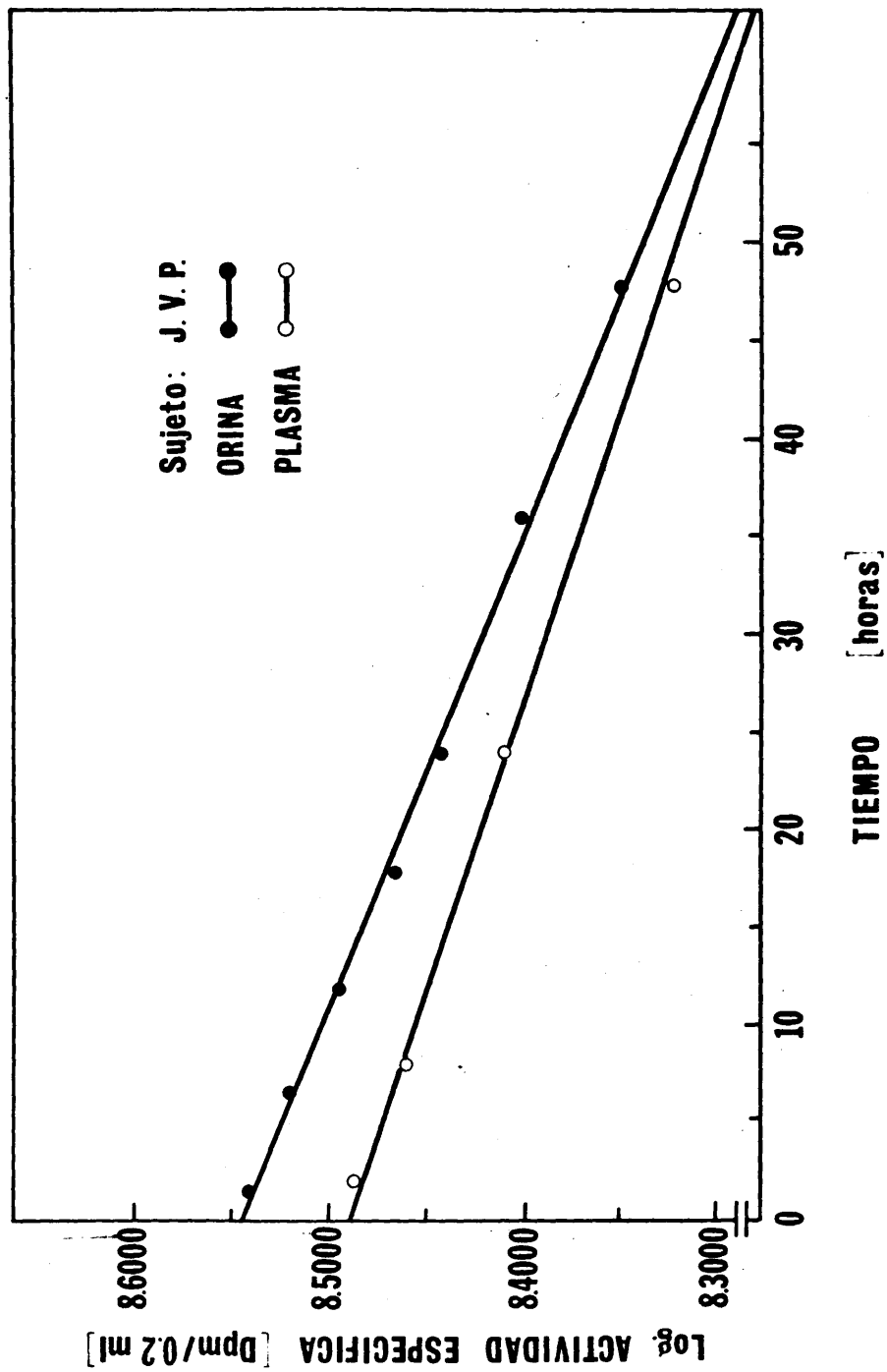


Orina: $A(t) = 6585 \cdot e^{-0.00313t}$ Plasma: $A(t) = 6267 \cdot e^{-0.00245t}$

$r = 0.8903$

$r = 0.9958$

FIGURA 32



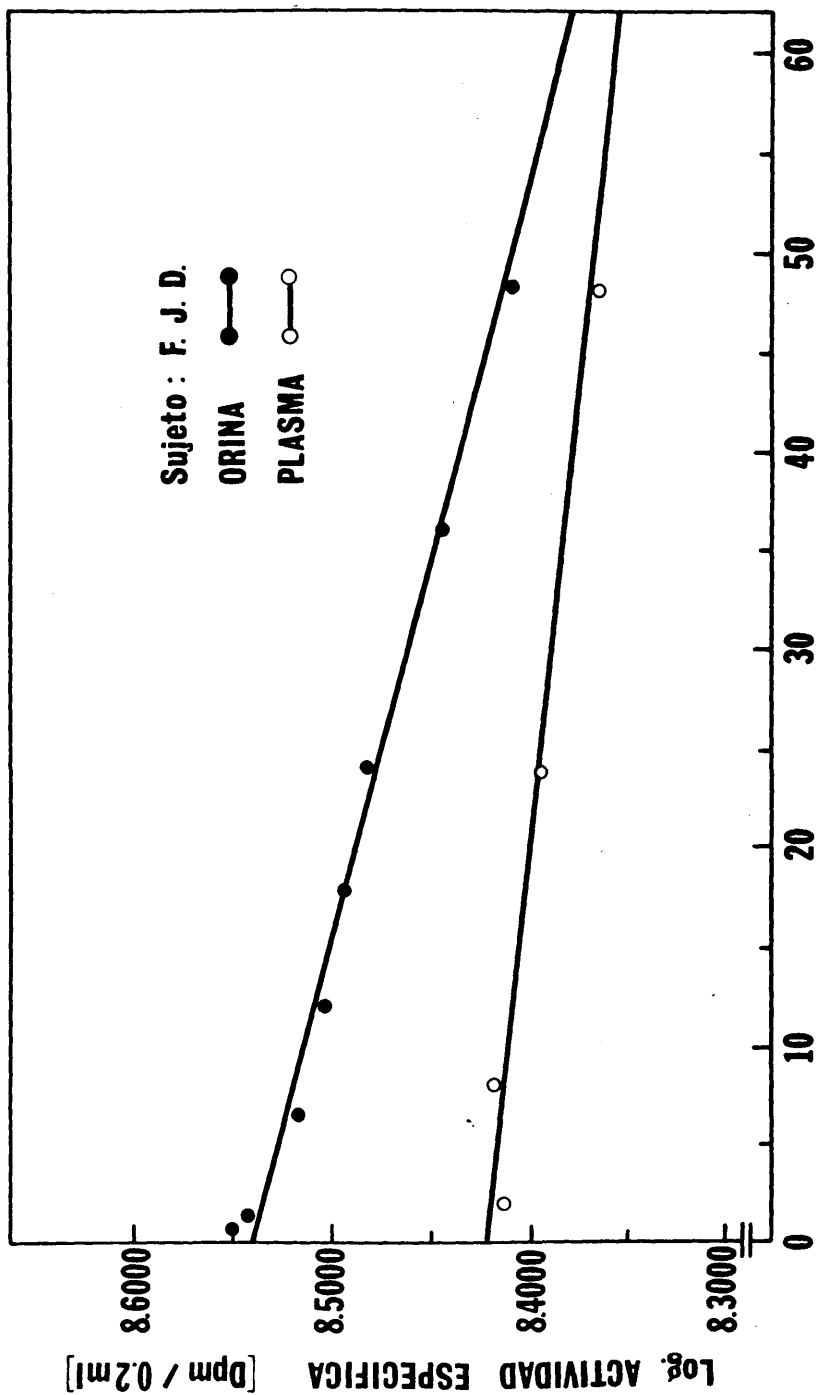
Plasma: $A(t) = 4843 \cdot e^{-0.00356t}$

$r = 0.9466$

Orina: $A(t) = 5038 \cdot e^{-0.00381t}$

$r = 0.9457$

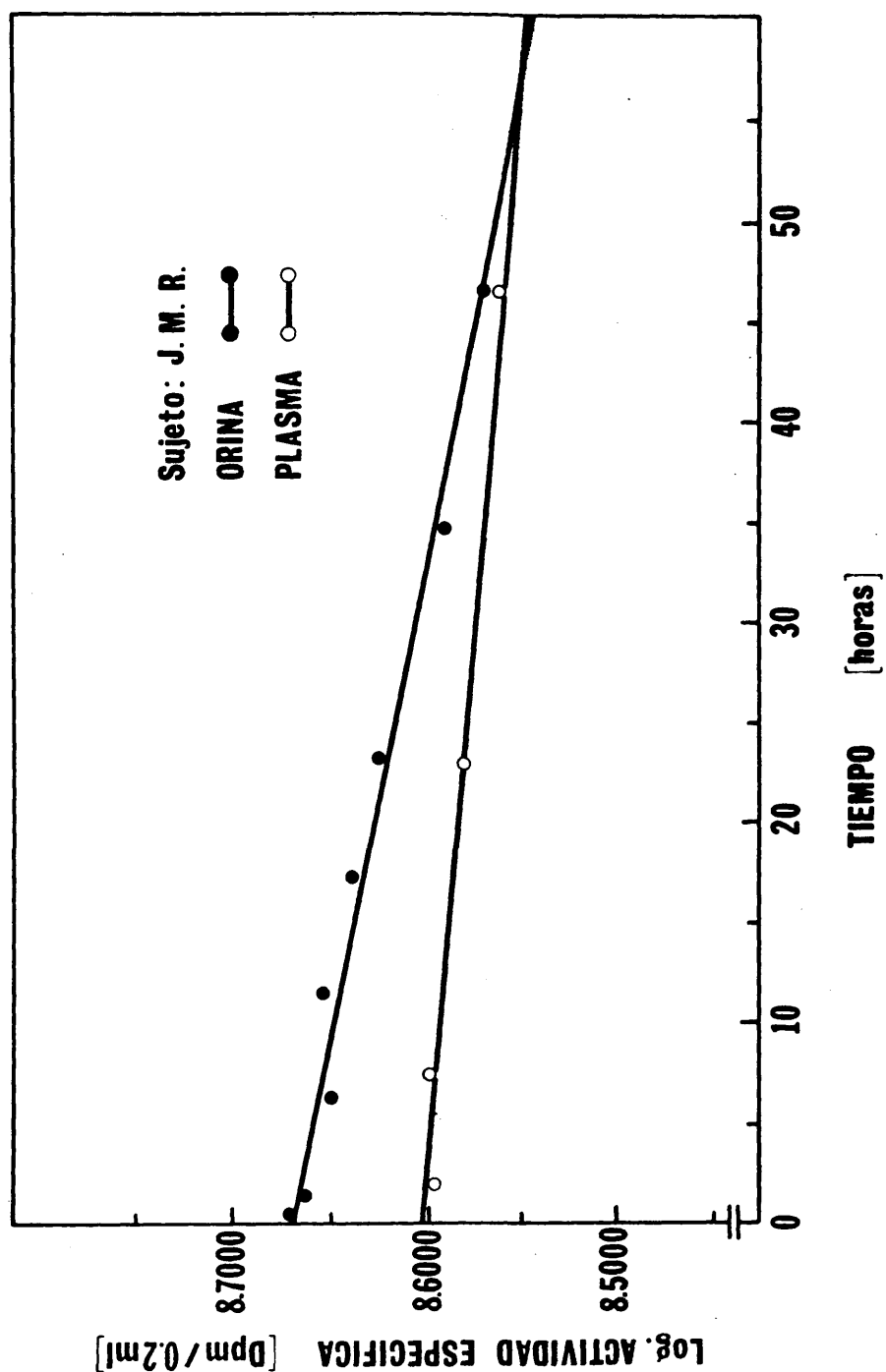
FIGURA 33



Orina: $A(t) = 5145 \cdot e^{-0.00264t}$ Plasma: $A(t) = 4529 \cdot e^{-0.00096t}$

$r = 0.9337$ $r = 0.9595$

FIGURA 34



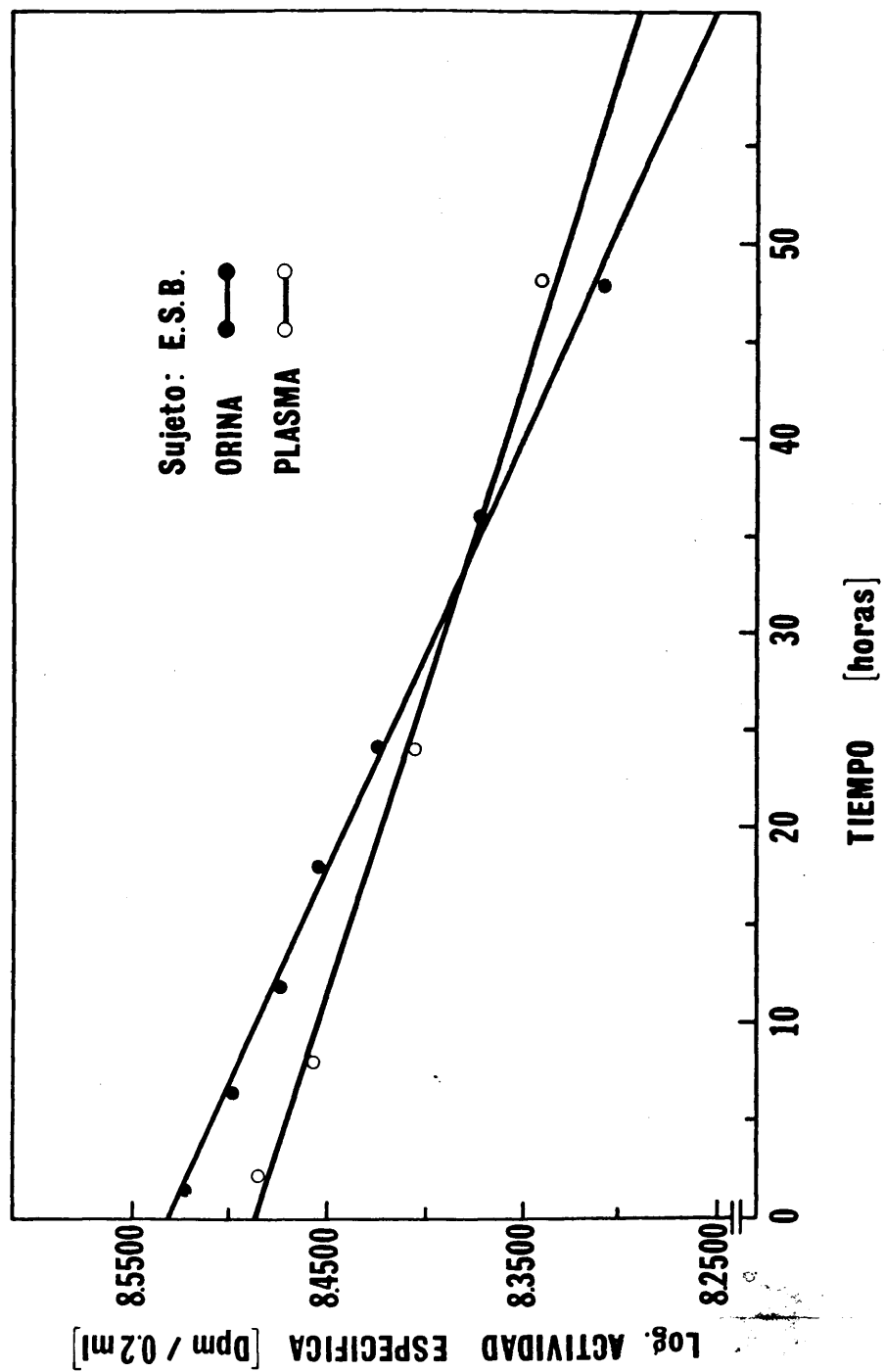
Orina: $A(t) = 5824 \cdot e^{-0.00195t}$

Plasma: $A(t) = 5441 \cdot e^{-0.00083t}$

$r = 0.9377$

$r = 0.8987$

FIGURA 35

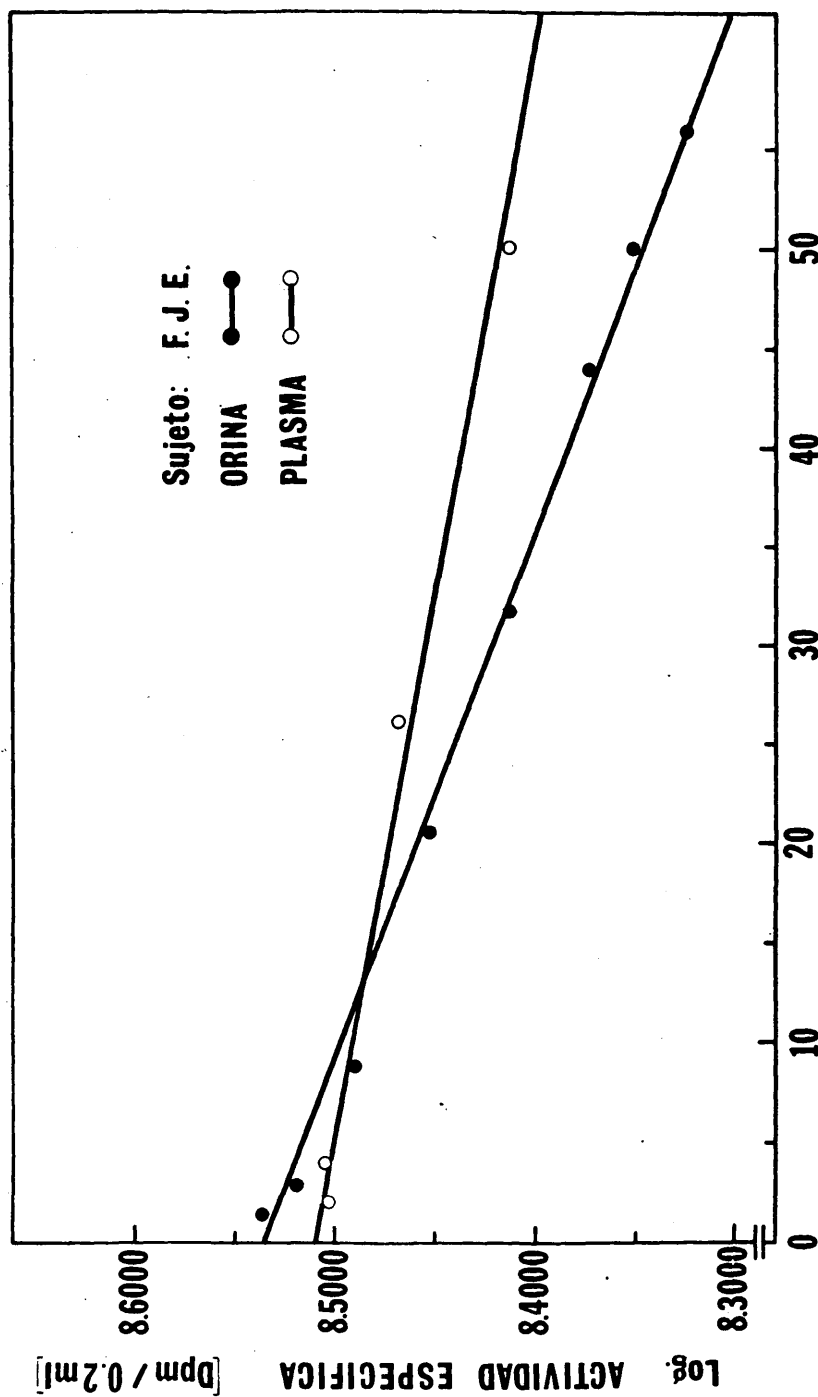


Orina: $A(t) = 5063 \cdot e^{-0.00451t}$ Plasma: $A(t) = 4771 \cdot e^{-0.00332t}$

$r = 0.9632$

$r = 0.8921$

FIGURA 36



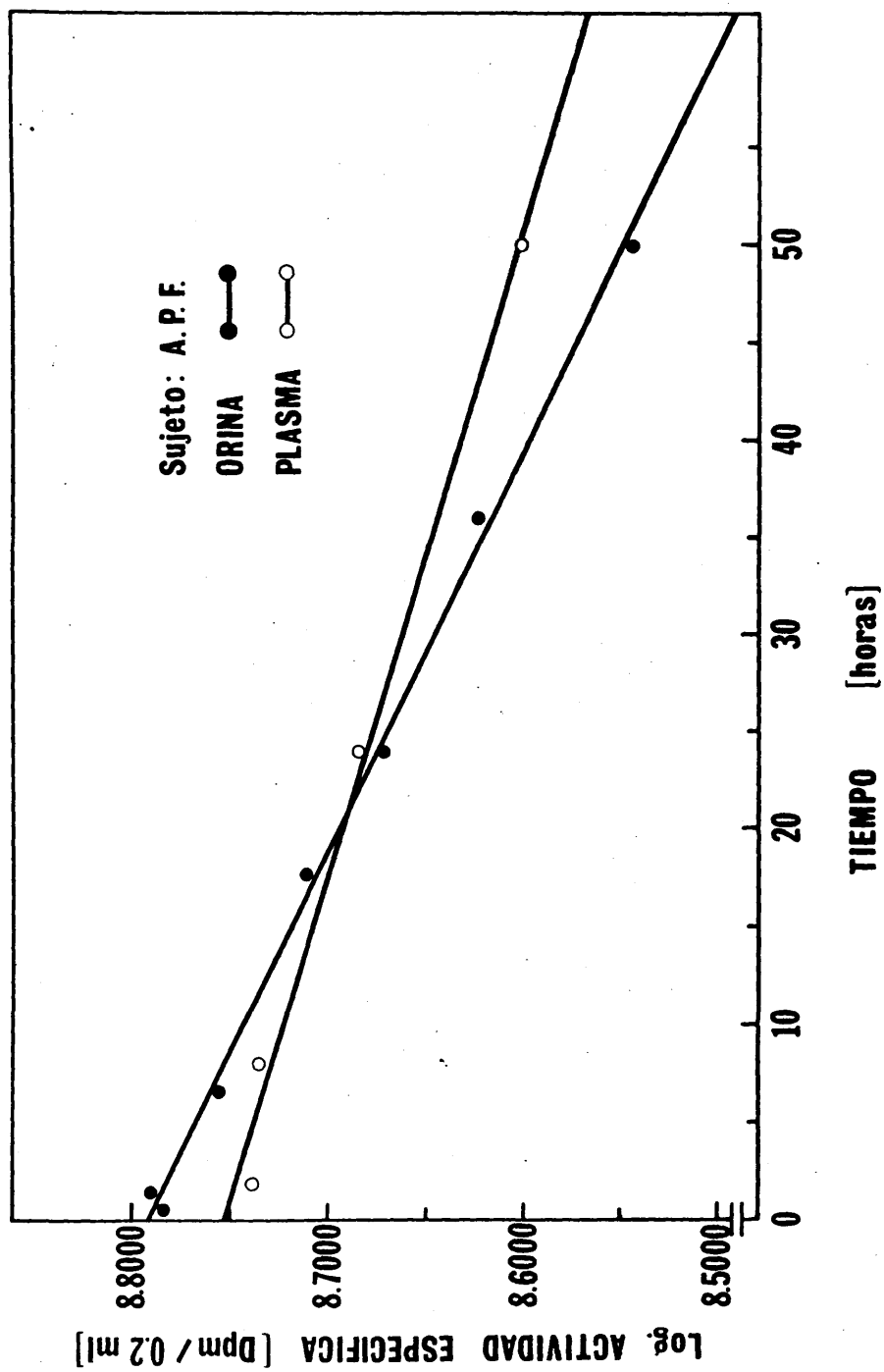
Sujeto: F.J.E.
 ORINA ●—●
 PLASMA ○—○

Orina: $A(t) = 5071 \cdot e^{-0.00369t}$ Plasma: $A(t) = 4983 \cdot e^{-0.00194t}$

$r = 0.9619$

$r = 0.9494$

FIGURA 37



Orina: $A(t) = 6576 \cdot e^{-0.00484t}$ Plasma: $A(t) = 6365 \cdot e^{-0.00308t}$
 $r = 0.9321$ $r = 0.9140$

FIGURA 38

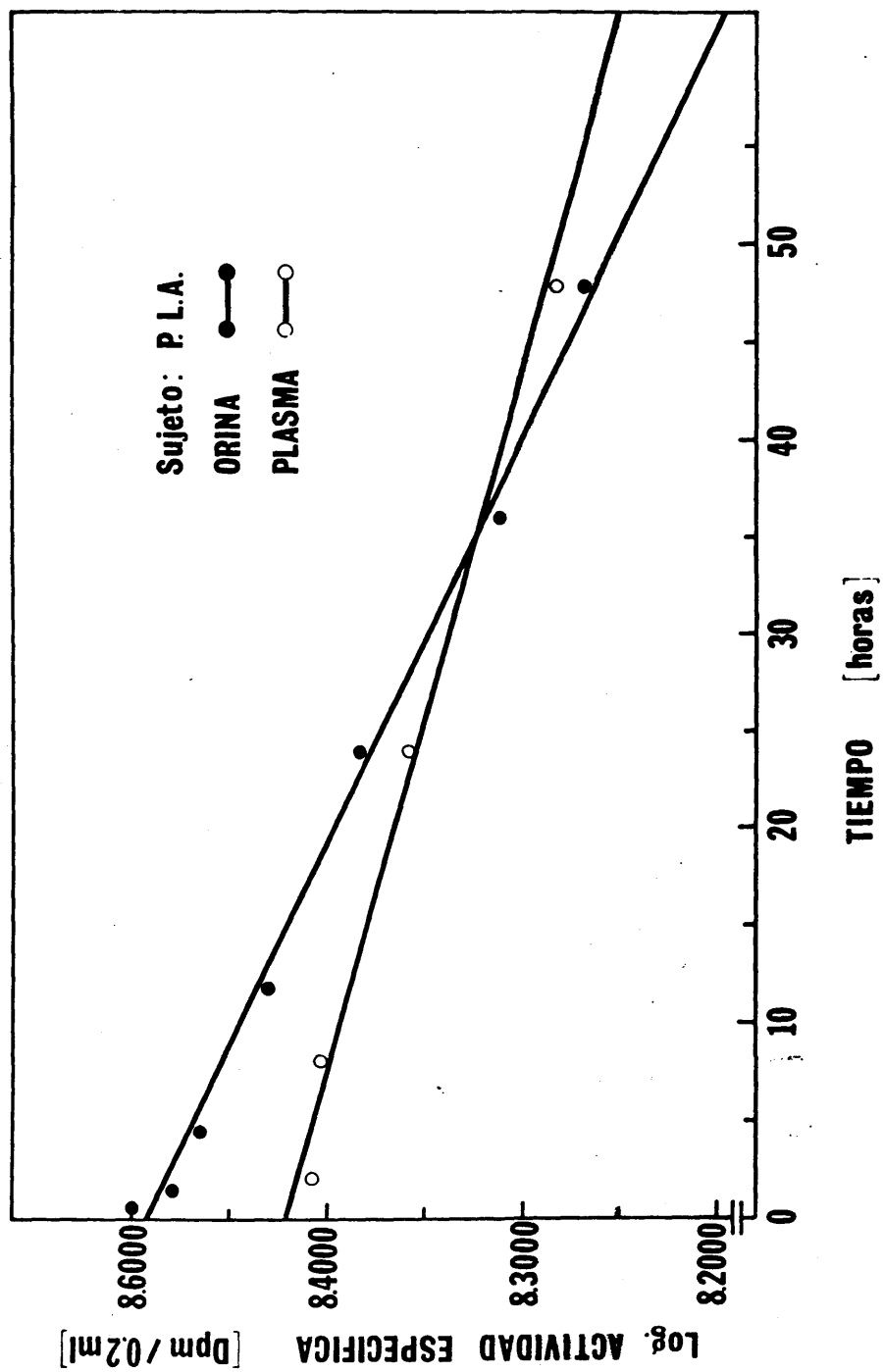


TABLA 15

COMPARACION DE LOS PARAMETROS DE LAS CURVAS
DE ACTIVIDAD DE H₂O EN PLASMA Y ORINA

SUJETO	A ₀ ORINA	A ₀ PLASMA	'K' ORINA	'K' PLASMA	'Z' ORINA	'Z' PLASMA
J M D	4196	3893	-0.00328	-0.00256	0.9508	0.9826
R A S	5868	5121	-0.00517	-0.00339	0.9299	0.9365
J S C	6585	6267	-0.00313	-0.00245	0.8903	0.9958
J Y P	5038	4843	-0.00381	-0.00356	0.9457	0.9466
F J D	5145	4529	-0.00264	-0.00096	0.9337	0.9595
J M R	5824	5441	-0.00195	-0.00083	0.9377	0.8987
E S B	5063	4771	-0.00451	-0.00332	0.9632	0.8921
F J E	5071	4983	-0.00369	-0.00194	0.9619	0.9494
A P F	6576	6365	-0.00484	-0.00308	0.9321	0.9140
P L A	4859	4601	-0.00476	-0.00295	0.8742	0.9218

MEDIA: 5422 5081 -0.00377 -0.00250

DESV. STD.: 770 767 -0.00104 -0.00097

TABLA 16

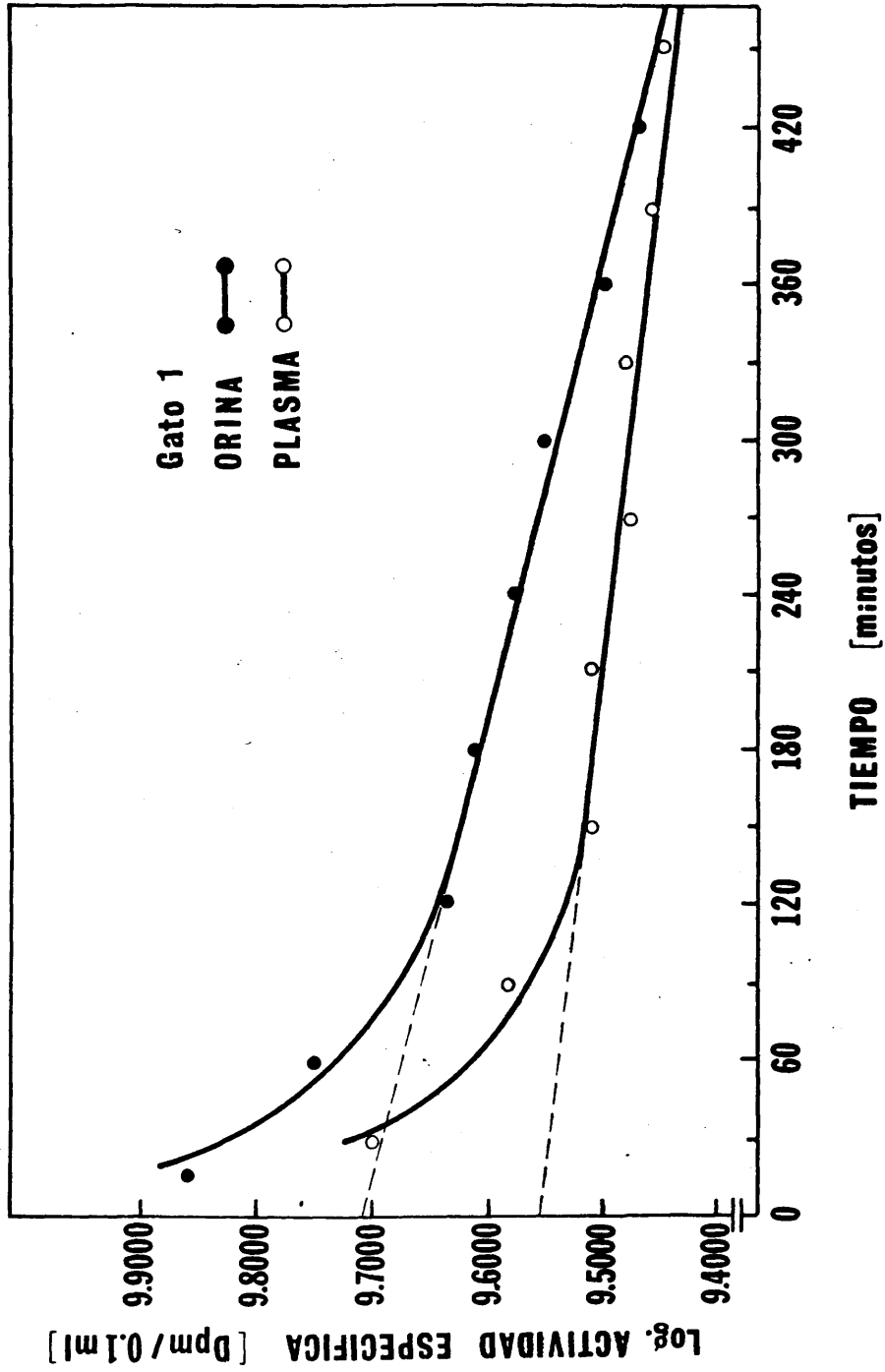
VOLUMEN DE AGUA CORPORAL TOTAL Y VIDA MEDIA BIOLOGICA DEL HTO

SUJETO	ORINA			PLASMA		
	VD	% PCM	T _{1/2}	VD	% PCM	T _{1/2}
JMD	44.7	68.5	8.8	48.9	75.0	11.2
RAS	39.1	70.8	5.6	44.9	81.1	8.5
JSC	34.9	62.2	9.2	36.7	65.3	11.8
JYP	45.6	68.6	7.6	47.4	72.9	8.1
FJD	44.6	70.3	10.9	50.7	79.9	30.1
JMR	39.4	58.4	14.8	42.2	62.5	34.8
ESB	45.4	72.7	6.4	48.1	77.1	8.7
FJE	45.3	74.0	7.8	46.1	75.3	14.9
APF	34.9	65.5	6.0	36.1	67.6	9.4
PLA	47.3	64.7	6.1	49.9	68.3	9.8
MEDIA	42.0	67.6	8.3	45.1	72.5	14.7
DESV. STD.	4.6	4.8	2.8	5.2	6.3	9.6

V_D = Volumen de Distribución del HTO; % PCM = Porcentaje del Peso Corporal Magro

T_{1/2} = Tiempo de Vida Media Biológica del HTO

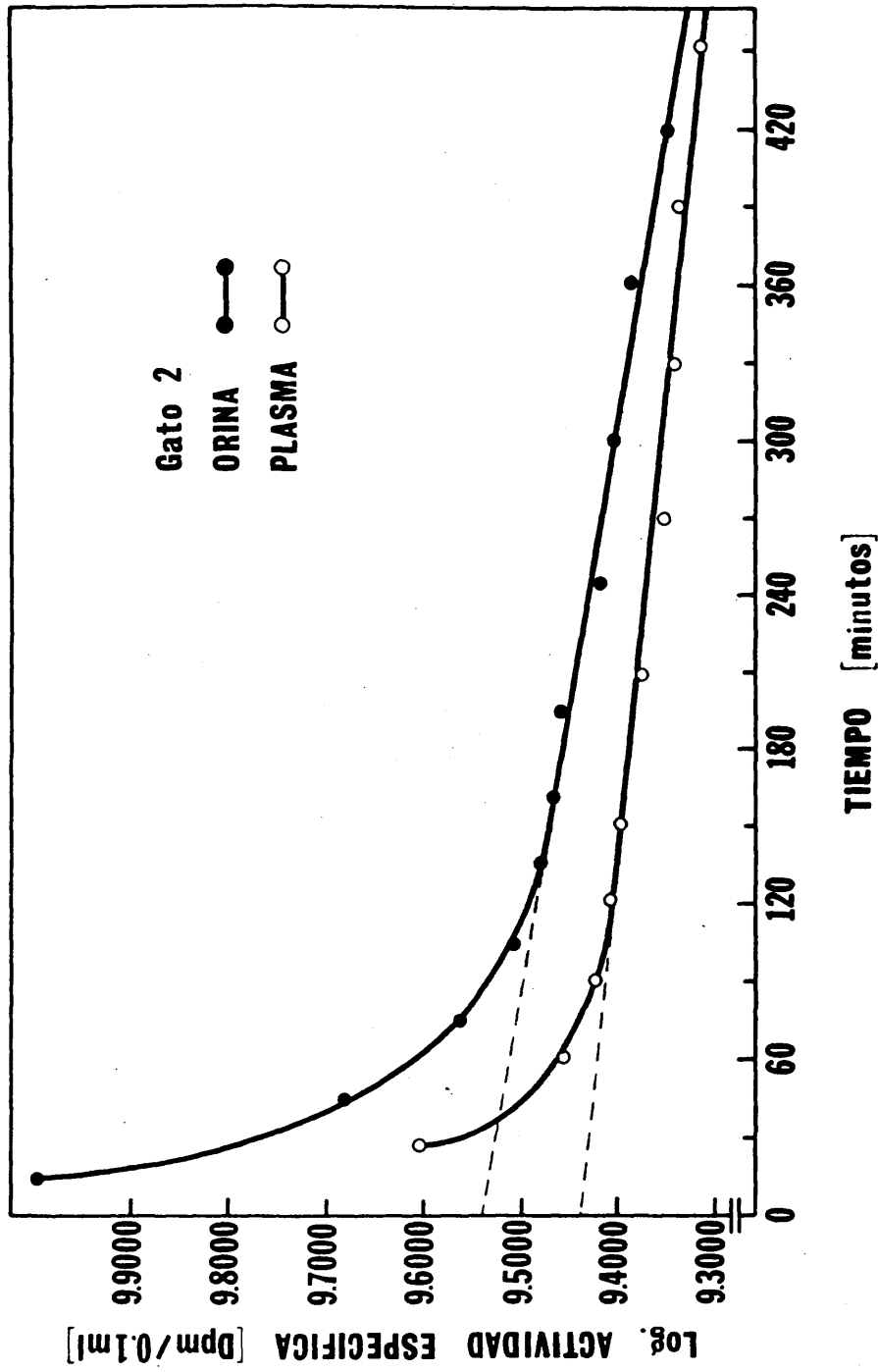
FIGURA 39



Orina: $A(t) = 17.965 \cdot e^{-0.0501t}$ Plasma: $A(t) = 15.278 \cdot e^{-0.0251t}$

$r = 0.9438$ $r = 0.9121$

FIGURA 40



Orina: $A(t) = 13.788 \cdot e^{-0.0254t}$ Plasma: $A(t) = 12.523 \cdot e^{-0.0171t}$

$r = 0.9283$

$r = 0.9327$

FIGURA 41

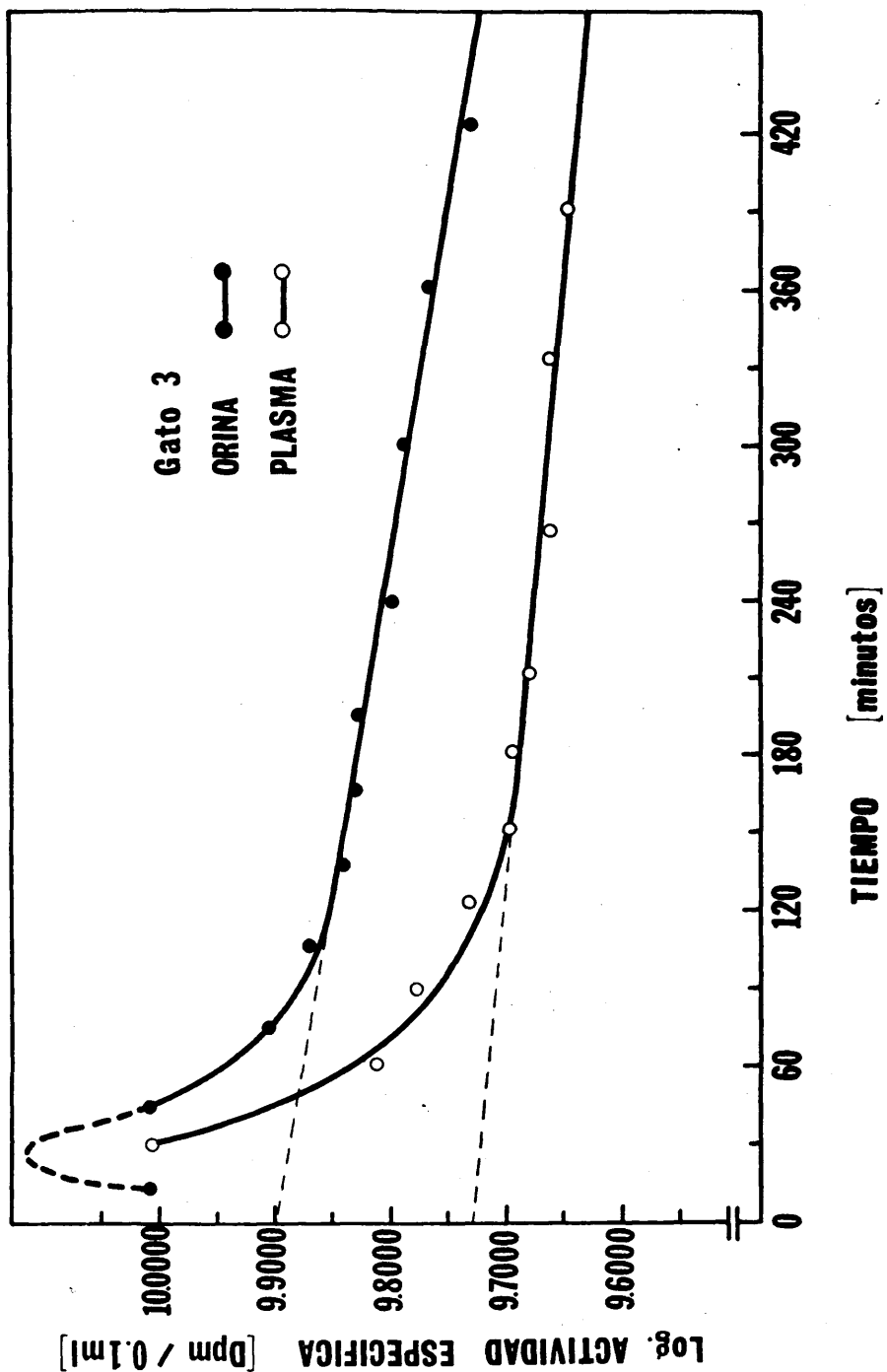
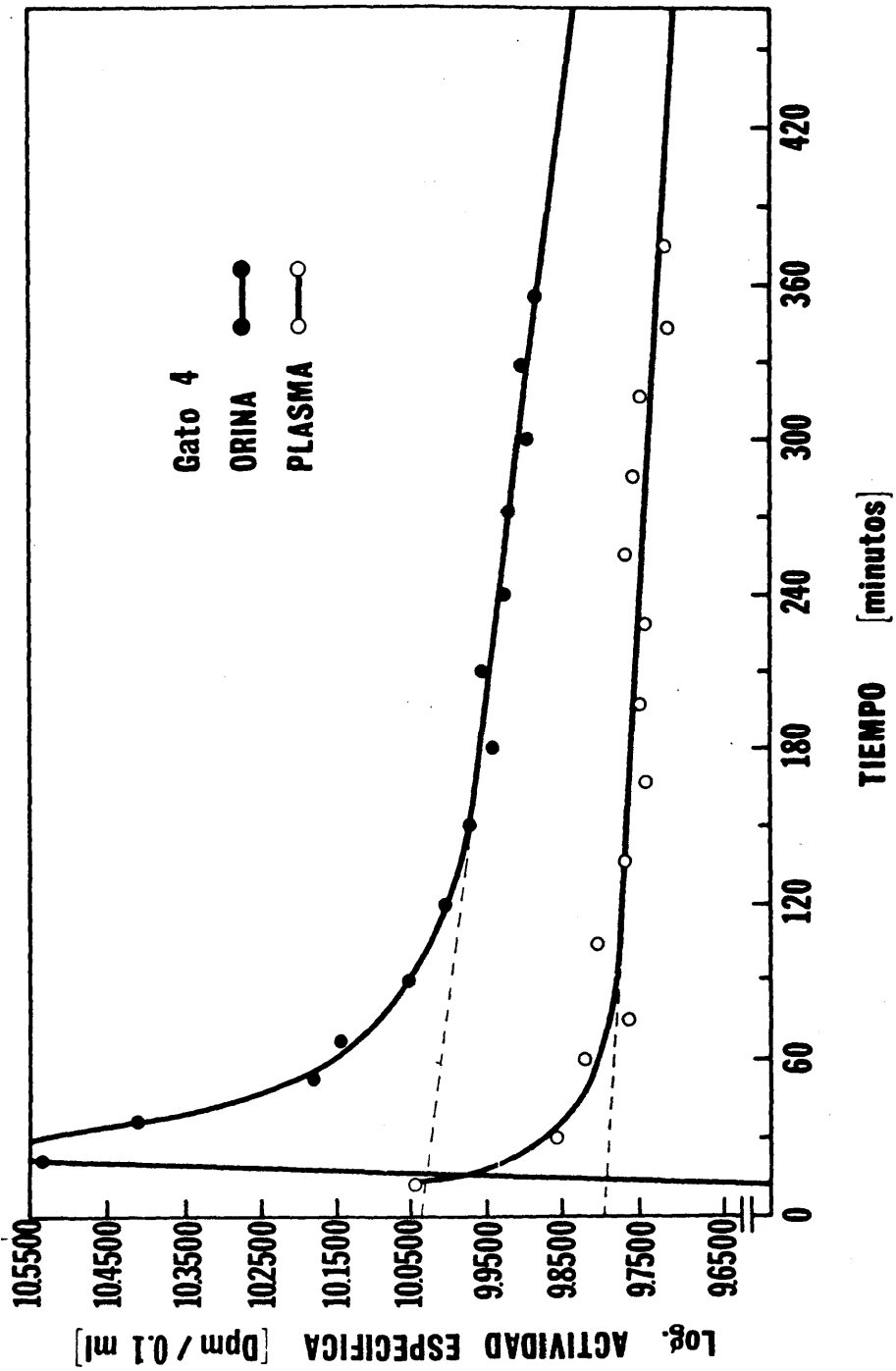


FIGURA 42



Orina: $23040 \cdot e^{-0.00042t}$; $r = 0.9090$
 Plasma: $18216 \cdot e^{-0.00020t}$; $r = 0.8467$

FIGURA 43

CINETICA DEL HTO EN ORINA, PLASMA Y LCR

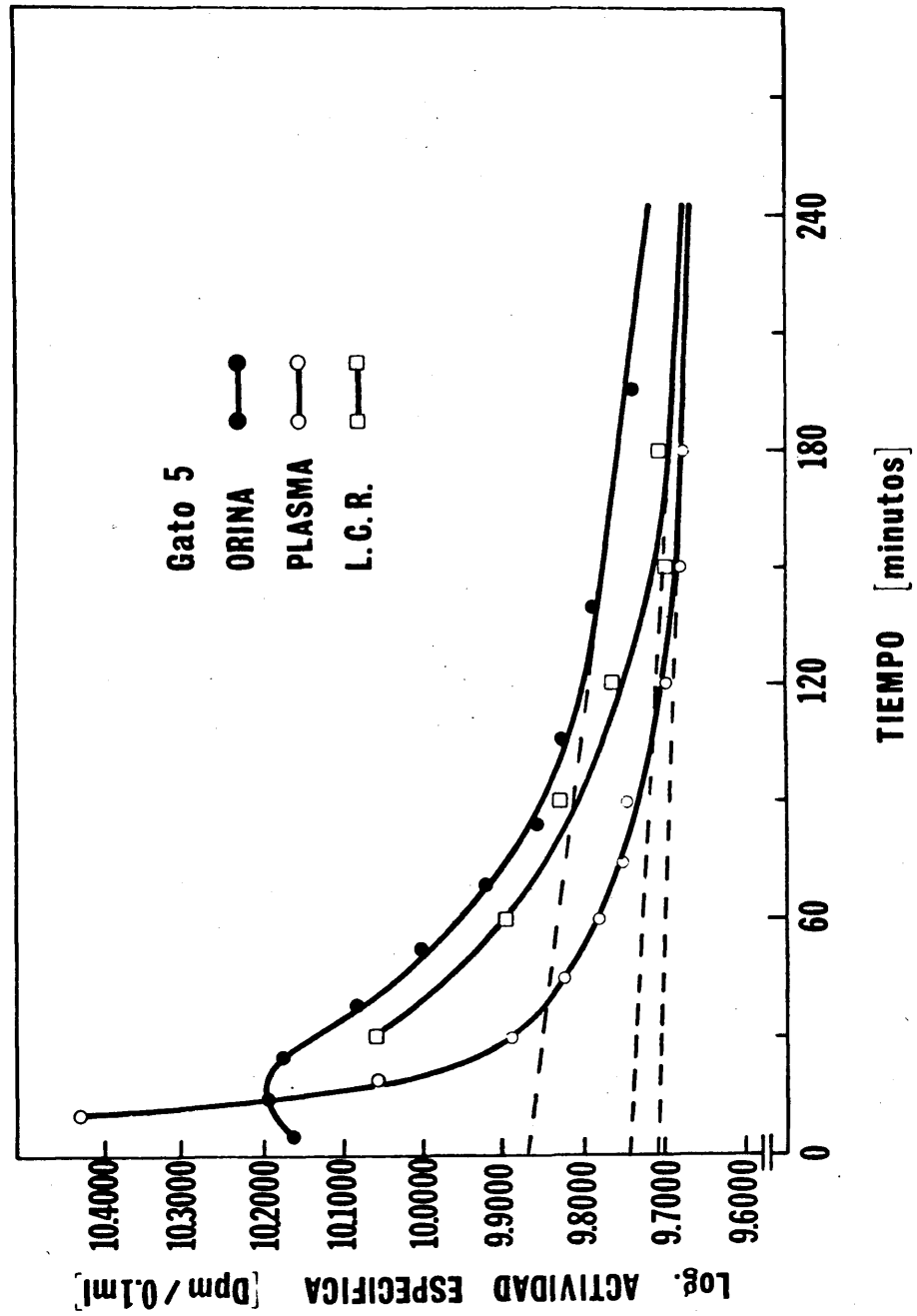
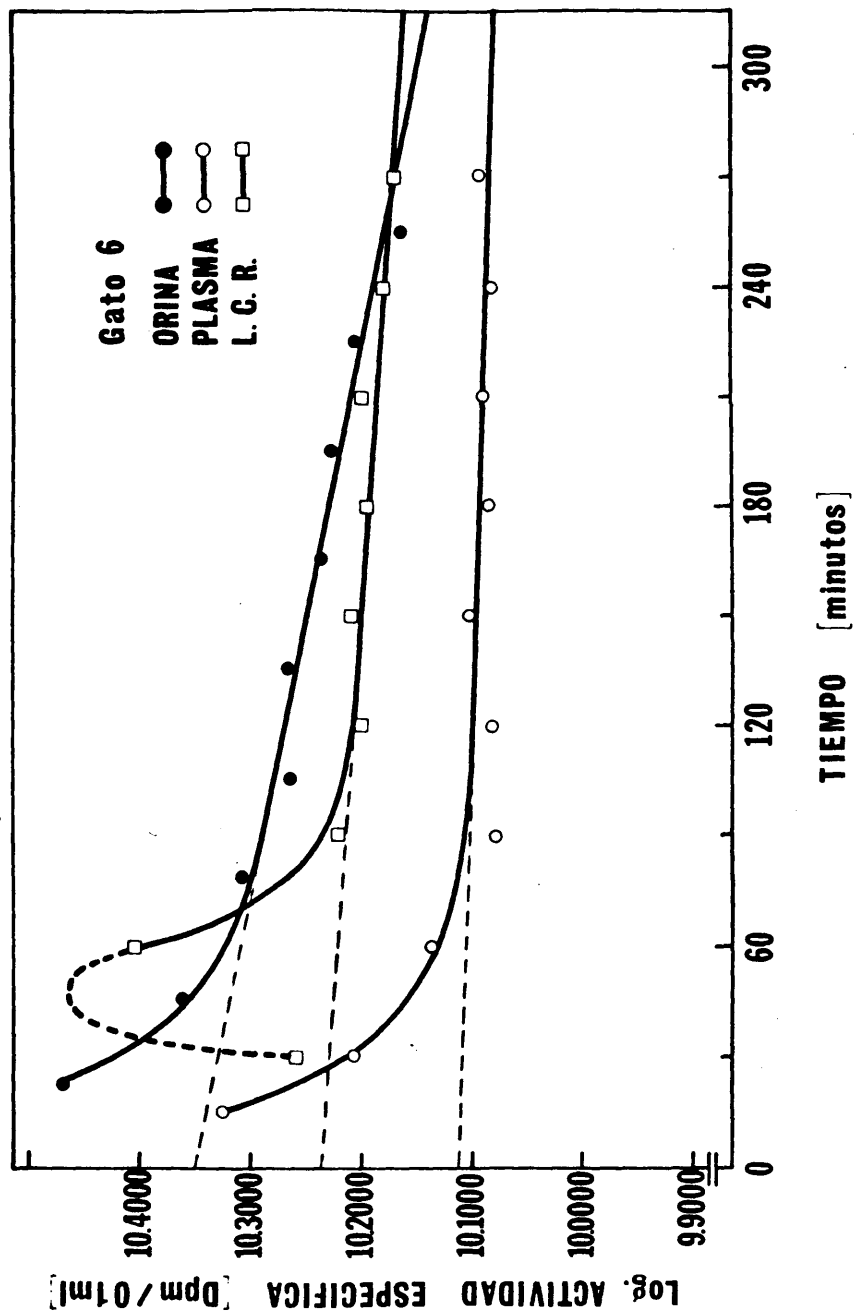
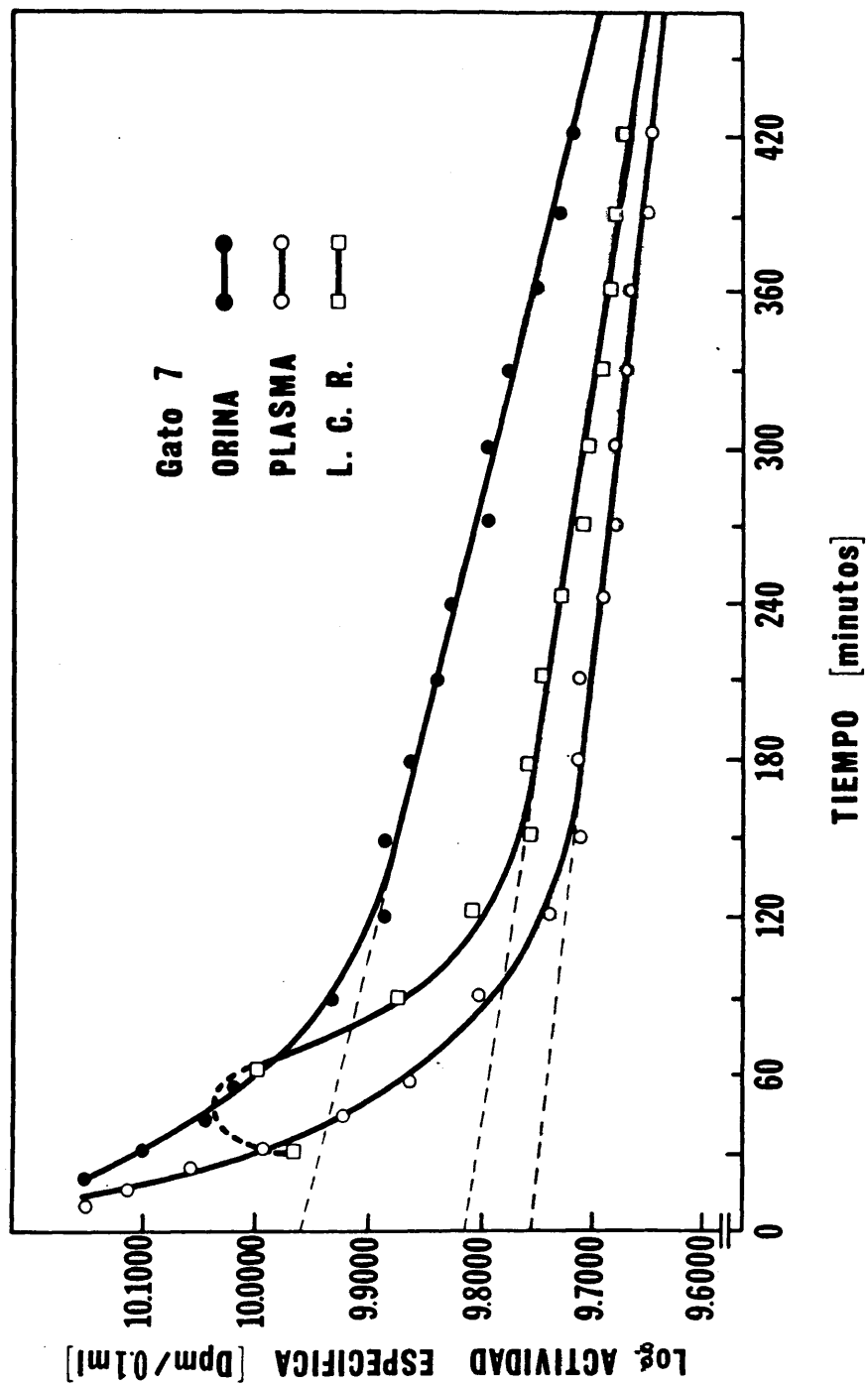


FIGURA 44



Orina: $A(t) = 31.257 \cdot e^{-0.000435t}$ Plasma: $A(t) = 24.523 \cdot e^{-0.000104t}$
 LCR: $= 27.446 \cdot e^{-0.000235t}$

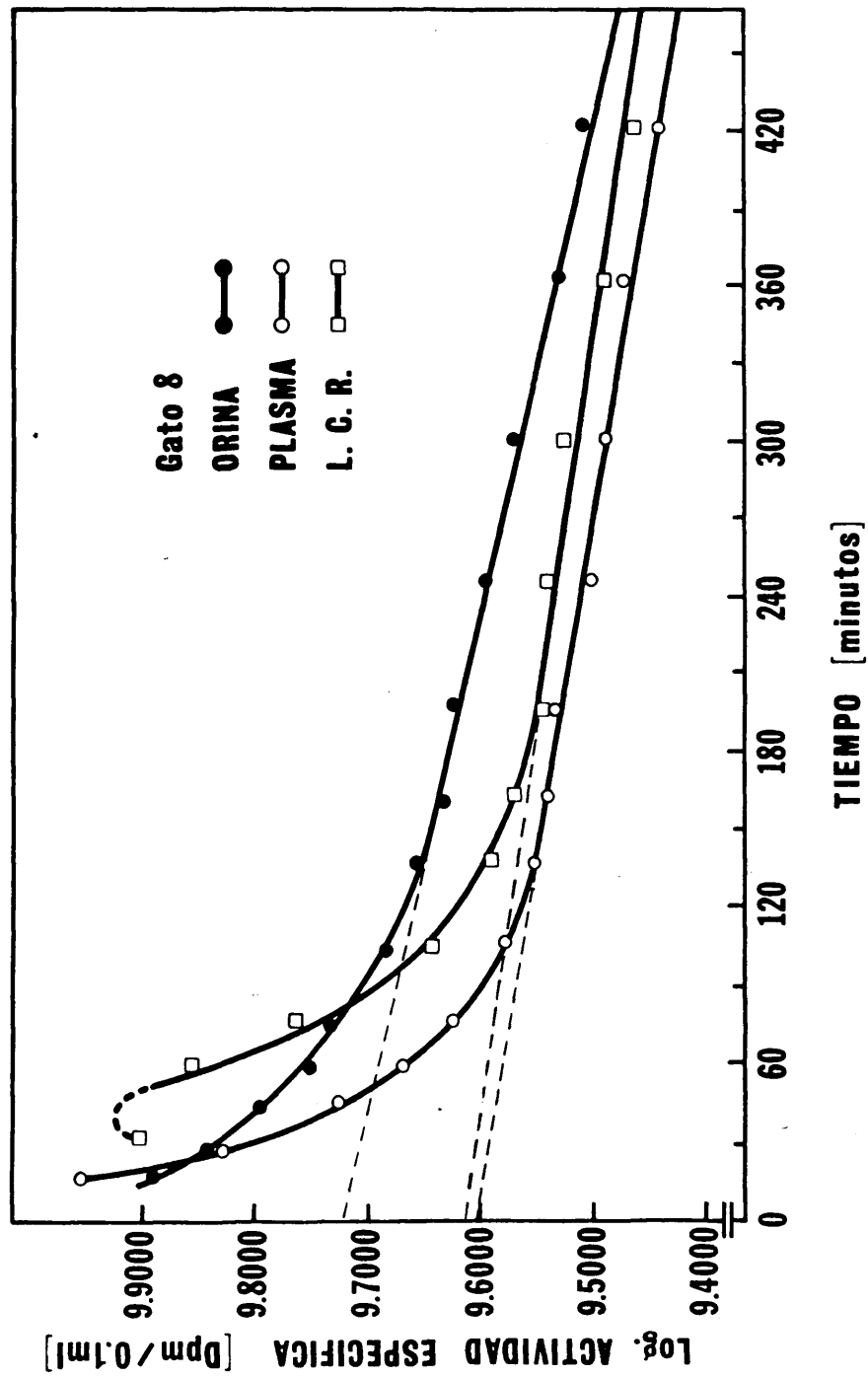
FIGURA 45



$$\text{Orina: } A(t) = 21.375 \cdot e^{-0.0508t} \quad \text{Plasma: } A(t) = 17.154 \cdot e^{-0.0369t}$$

$$\text{L.C.R.: } A(t) = 18.389 \cdot e^{-0.0407t}$$

FIGURA 46



Orina: $A(t) = 17.154 \cdot e^{-0.0468t}$ Plasma: $A(t) = 14.750 \cdot e^{-0.0397t}$

L.C.R.: $A(t) = 15.063 \cdot e^{-0.0341t}$

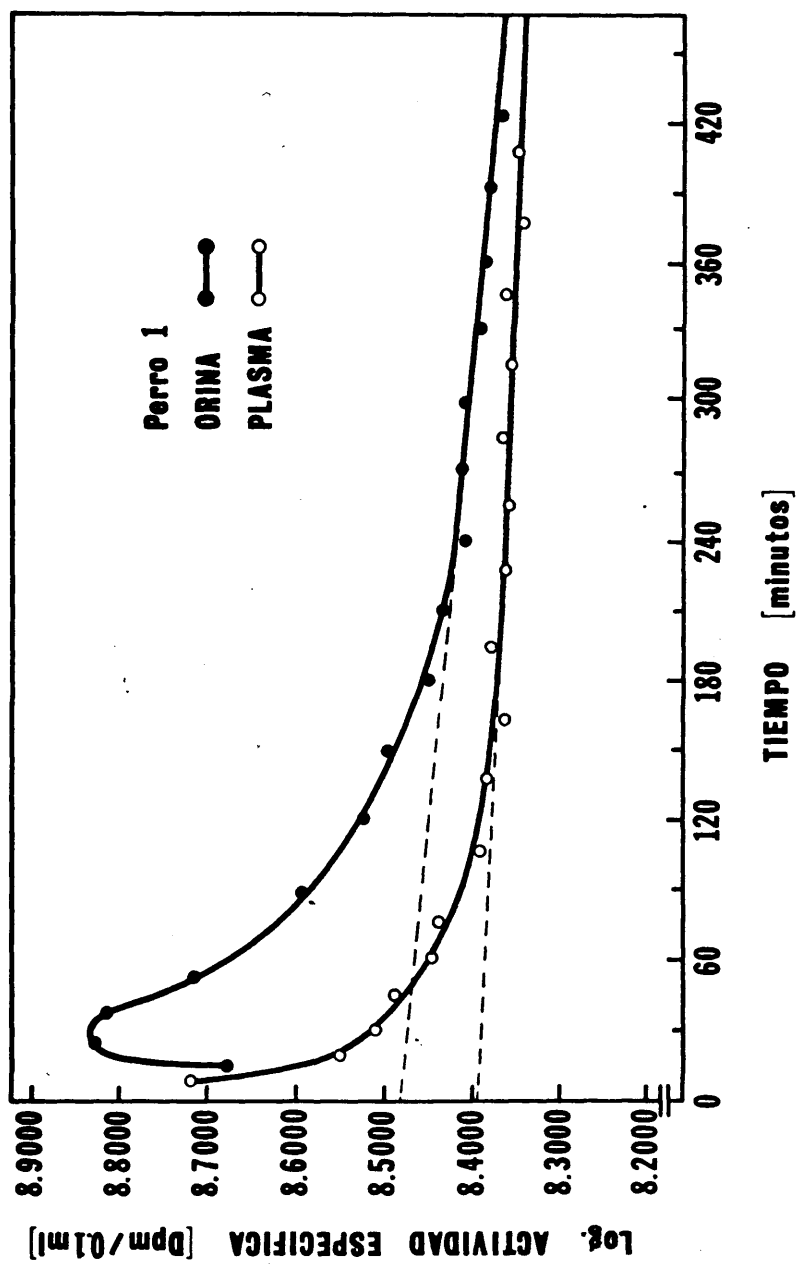
TABLA 17

COMPARACION DE LOS PARAMETROS DEL ULTIMO TERMINO EXPONENCIAL
DE LAS CURVAS DE ACTIVIDAD DE HTO EN PLASMA ORINA Y LCR

GATO	ORINA		PLASMA		LCR	
	A_0	K	A_0	K	A_0	K
1	17.965	-0.0501	15.278	-0.0251		
2	13.788	-0.0254	12.523	-0.0171		
3	19.614	-0.0205	17.174	-0.0182		
4	23.040	-0.00042	18.216	-0.00020		
6	31.257	-0.00043	24.523	-0.00010	27.446	-0.00023
7	21.375	-0.0508	17.154	-0.0369	18.398	-0.0407
8	17.154	-0.0468	14.750	-0.0397	15.063	-0.0341

A_0 y K: Ordenada en el origen y periodo del último término exponencial

FIGURA 47



Orina: $A(t) = 47.75 \cdot e^{-0.000237t}$ Plasma: $A(t) = 44.26 \cdot e^{-0.000110t}$

$r = 0.8937$

$r = 0.8586$

CAPITULO SEXTO.-

DISCUSION Y CONCLUSIONES.-

Como dijimos anteriormente, nuestro trabajo experimental ha seguido una doble vertiente.

Primeramente, establecer las bases metodológicas de una técnica de estimación del Volumen de Agua Corporal Total mediante dilución de Agua Tritiada en el hombre, que reuniese las condiciones de extremada simplicidad, bajo coste y mínima molestia para el sujeto, a la vez que las de máxima exactitud y reproducibilidad.

Nuestro segundo objetivo ha sido el de aplicar dicha técnica a comprobar la validez de algunas de las bases conceptuales de los métodos de estimación del Agua Corporal hoy día en uso.

Concretamente, establecer si se llega a alcanzar un equilibrio entre las concentraciones del trazador en los distintos líquidos corporales, y en caso afirmativo cuánto tiempo tarda en alcanzarse dicho equilibrio. Para ello hemos comparado los resultados publicados en algunos estudios previos con los obtenidos por nosotros con ayuda de una instrumentación y una metodología más avanzada.

En las páginas siguientes vamos a estudiar brevemente los resultados conseguidos en la prosecución de estos objetivos, discutiendo su posible significación hasta llegar a postular las conclusiones definitivas de esta tesis.

1. METODOLOGIA

Desde el punto de vista metodológico, nuestro primer problema fué la selección de una Mezcla de Centelleo capaz de mantener en solución muestras acuosas, en un volumen suficiente para permitir determinaciones con un error estadístico pequeño aún con baja actividad de la muestra.

Nuestros resultados con la Mezcla de Centelleo descrita por Butler (1961), aceptada como método oficial de la Association Official Analytical Chemists de EEUU (Sodd y Scholz, 1969), nos hicieron rechazar ésta por la mala solubilización de la orina en ella, estableciéndose una separación en dos fases entre la orina y la Mezcla, conducente a la autoabsorción de las partículas beta en la muestra de orina, y a resultados erráticos en las determinaciones de su actividad. En su trabajo original, Butler (1961) describió, sin embargo, como proporción óptima la de 3 ml de orina en 13 ml de mezcla. La única explicación a tal discrepancia podría estar en un diferente grado de pureza química en los componentes de la mezcla, aunque nosotros hemos usado sistemáticamente reactivos de grado de pureza "Para Mediciones de Espintariscopia" equivalente al "Scintillation Grade" de los anglosajones.

Las concentraciones óptimas de solutos y solvente secundario para una Mezcla de Centelleo con un sistema de solvente basado en el dioxano, que hemos determinado experimentalmente atendiendo a Eficiencia obtenida y Coste, coinciden con las de una mezcla descrita por White (1968) con la denominación de Mezcla Y. Esta además de contener 8gr./litro de PPO y 600mgr./litro de dimetil-POPOP en un sistema Dioxano/Naftaleno con 120gr./litro de este último, lleva incorporados 100 ml de EtoxiEtanol y 20 ml de Etilenglicol que contribuyen a aumentar la capacidad de solubilización de muestras acuosas (Rapkin, 1963; Parmentier y Ten Haaf, 1969).

Las concentraciones de soluto de la Mezcla de Centelleo de Bray (1960), similar en composición cualitativa, son aproximadamente la mitad, lo que se traduce en una Eficiencia mucho menor aunque su capacidad de solubilización es casi igual. Sin embargo, no consideramos necesario el incrementar las concentraciones al nivel de la Mezcla de Davidson y Feigelson (1957), una de las primeras descritas y en amplio uso aún, puesto que como se desprende de los resultados en la Figura 26, una concentración de 12gr./litro de PPO no va a traducirse en una Eficiencia lo bastante elevada como para justificar su coste, e incluso puede resultar en un aumento del autoapagamiento, tendencia que se a-

punta en la Figura 26 para una concentración de PPO de 10gr./litro.

En el estudio comparativo de varias Mezclas de Centelleo de uso corriente, aplicadas a la determinación de Tritio en muestras biológicas, (Tabla 12), la Mezcla y de White nos proporcionó la mejor Eficiencia de conteo para Tritio en muestras de orina y plasma. La Mezcla de Butler dió unos resultados similares, aunque ya hemos apuntado el problema de su bajo poder solubilizante. Las Eficiencias obtenidas con la Mezcla de Bray (1960) confirman lo dicho anteriormente al discutir su composición. También fueron inferiores los resultados obtenidos con Instagel^R de Packard Instruments Co., mezcla que lleva un agente solubilizador incorporado.

En la preparación de las muestras de líquidos biológicos para el Contaje en Centelleo Líquido, tratamos desde un principio de obtener la máxima simplicidad, en orden a reducir el coste de las determinaciones y tiempo empleado en ellas y a minimizar la manipulación de las muestras, con sus errores inherentes. Los resultados obtenidos con los métodos más simples de preparación de muestras, esto es, la precipitación de las proteínas plasmáticas con diversos agentes y la decoloración de la orina, confirman los datos

recogidos por Rapkin (1969) de que las ganancias en Eficiencia no son suficientemente altas como para justificar la utilización de estos procedimientos que sin embargo han sido bastante empleados (Bell y Hayes, 1958; Rapkin, 1963).

Los procedimientos de extracción del agua de los líquidos corporales por destilación en vacío (Mc Taggart y Cardus, 1968; Cardus y cols., 1969) o liofilización (Langham y cols., 1956) son preferibles por proporcionar no solo una mejor Eficiencia de Contaje sino también una mayor exactitud en las determinaciones al suprimir el error introducido en el volumen de muestra pipeteado al vial por los sólidos en solución.

El método de microdestilación en vacío descrito por Mc Taggart y Cardus (1968), presenta la ventaja de utilizar un equipo especialmente simple y no requerir sistemas de alto vacío como los métodos de liofilización.

Un posible inconveniente de este método y sus similares sería, (Davidson y Feigelson, 1957; Parmentier y Ten Haaf, 1969), la aparición de un fraccionamiento isotópico por una diferencia en la tasa de evaporación entre el Protio y el Tritio que conduciría a una menor concentración del Tritio en el agua destilada. Mc Taggart y Cardus (1968)

no hallaron diferencias entre las Actividades de Tritio encontradas entre muestras de agua destilada y muestras del plasma o la orina originales, aunque sí hallaron un cierto grado de fraccionamiento isotópico al destilar agua. Nosotros hemos hallado una pequeña diferencia entre la Actividad de Tritio en el agua destilada y el agua remanente en el depósito del frasco de microdestilación, pero esta diferencia no fué estadísticamente significativa (Tabla 11).

Los resultados obtenidos al contar pequeños volúmenes (0.2 ml) de plasma y orina marcados con Agua Tritiada, o alícuotas iguales de agua destilada a partir de los mismos, con la Mezcla de Centelleo Y de White, mostraron suficiente similitud para decidirnos a emplear el primer procedimiento para la determinación de Tritio en plasma y orina cuando no podíamos disponer de los volúmenes de éstos requeridos por el método de microdestilación en vacío.

Por último, para completar este comentario de nuestra metodología, queremos referirnos a los programas que presentamos para el cálculo de Actividades Absolutas con corrección del apagamiento por el método del Cociente de Canales o de Standardización Externa en un calculador pro -

gramable de sobremesa "Programma 602".

Se ha publicado una amplia serie de programas para realizar estos cálculos en Computadores Digitales (Hansen y Carroll, 1971, Barba y cols., 1971) pero muy pocos (Williams y cols., 1970) para la utilización de calculadores de sobremesa, siendo así que los cálculos no presentan una complejidad excesiva y, además, que no son todavía tantos los centros de investigación que poseen o tienen acceso a un Computador Digital, al menos en nuestro país.

Williams y cols. (1970) han discutido el uso de uno de estos programas para ajustar la relación Eficiencia/Cociente de Canales para el Standard Externo a un polinomio de segundo grado, lo que generalmente da resultados de suficiente exactitud (Hansen y Carroll, 1971), aunque no publican el programa utilizado. Nosotros creemos que puede ser de alguna utilidad el describir los programas con cierto detalle.

2. CINETICA DEL AGUA TRITIADA EN EL ORGANISMO

Los conceptos actuales sobre el metabolismo y distribución del agua corporal, responden todavía a la formulación de El Kinton (1950) de considerar el organismo de un mamífero constituyendo una fase acuosa continua (Bland,

1963).

Manery en 1954 ya señaló que la heterogeneidad de la fase extracelular hace improbable el que cualquier método de dilución de trazadores sea adecuado para dar una delimitación exacta de la totalidad del agua y los electrolitos no intracelulares.

Esta heterogeneidad fué esquematizada en el modelo de distribución del agua corporal propuesto por Edelman y Leibman, (1959) representado en la Figura 1; apuntando también estos autores la posibilidad de que la progresión de los métodos analíticos pondrían de relieve subdivisiones igualmente amplias en la fase intracelular, posibilidad que va siendo confirmada (Baron y Ahmed, 1968).

Sin embargo el modelo cinético que se viene utilizando en las estimaciones del Volumen de Agua Corporal Total por dilución de trazadores, sigue siendo el modelo de un compartimiento abierto. Es decir, se considera a las fases intra y extracelular con todas sus subdivisiones, tratadas en el Capítulo Primero, como si formaran un solo compartimento, en el que, además, el trazador se distribuirá rápidamente, y alcanzará una concentración homogénea a todo su través.

A estas tres asunciones, se añade otra más en la mayor parte de los estudios realizados: la de que la Tasa de Recam_

bio del trazador es siempre lo suficientemente pequeña como para poder considerarla negligible en experimentos de corta duración con respecto a la vida media del trazador.

El fundamento teórico de la utilización de un modelo de un compartimento abierto para estudiar el comportamiento del trazador en este sistema multicompartimental está en la aparición, pocas horas después de la inyección, de un equilibrio en el sistema.

Este equilibrio se define como el momento en que los cambios en la concentración (o actividad específica) del trazador se hacen muy graduales con respecto a los intervalos de tiempo en el muestreo, y en que se puede demostrar una uniformidad razonable en las concentraciones del trazador en todos los líquidos corporales (Moore, 1968).

La demostración experimental de este equilibrio para la distribución del Agua Tritiada en el Agua Corporal Total fué realizada por Pinson y Anderson (1952), Prentice y cols. (1952) y Pinson y Langham (1957).

Pinson y Langham (1957), resumiendo estudios previos, comunicaron que al ingresar el Agua Tritiada en el organismo por cualquier vía (Véase Capítulo Primero, Apartado 3.1.)

la actividad de Tritio en sangre aumentaba rapidamente hasta llegar a un máximo y después decrecía lentamente hasta que se obtenía un equilibrio con todos los líquidos corporales a las 2 o 2.5 horas tras la administración del Agua Tritiada, no pudiéndose detectar cambios en la actividad de Tritio a partir de ese momento, dentro de la sensibilidad del método analítico.

La actividad en la orina fué un 3-5% más alta que la del plasma entre los 30 y los 60 minutos tras la inyección, siguiendo después estrechamente a la actividad en el plasma. A partir de las 2.5 horas, la actividad de Tritio en el sudor, perspiración insensible, vapor de agua espirado, esputos, orina y sangre fué esencialmente la misma dentro de los límites de detección.

Sobre esta premisa se ha basado la metodología de las estimaciones en los estudios posteriores. Se ha comenzado el muestreo de la actividad del trazador después de transcurridas dos o tres horas tras la inyección, se ha realizado este muestreo generalmente solo en uno de los líquidos corporales puesto que la actividad es la misma en todos ellos, se han tomado un número reducido, dos o tres usualmente, de muestras puesto que el cambio en la actividad del trazador con el tiempo es muy pequeño para un experimento de corta duración, y se ha determinado el volumen de distribución del trazador a partir de la actividad

de una de estas muestras (o del promedio de varias), considerada como actividad específica en el equilibrio según la fórmula

$$V_{\text{DIST.}} = R / X_E$$

Donde, $V_{\text{DIST.}}$ = Volumen de Distribución

R = Cantidad absoluta de trazador introducido
en el sistema

X_E = Actividad Específica del Trazador en el
Equilibrio

Sin embargo Gundersen y Shen (1966) en un estudio sobre el Agua Corporal Total en relación a la obesidad, encontraron diferencias entre los volúmenes de Agua Corporal estimados a partir de las actividades en plasma a las 2, 4 y 6 horas. Las diferencias entre los valores estimados sobre las actividades a las 2 y 6 horas fueron de ± 1 litro en un 64% de los sujetos, de ± 1.5 a 2 litros en un 18% y de ± 2.5 a 4 litros en otros 18%. Un 72.5% de los sujetos mostró una diferencia de ± 1 litro entre los valores estimados a partir de la actividades a las 4 y 6 horas, esta diferencia aumentó a ± 1.5 a 2 litros en un 12.5% y a ± 2.5 a 4 litros en otro 12.5% de los individuos estudiados.

Las actividades en orina y plasma, estudiadas en tres sujetos fueron también distintas entre si en el periodo comprendido entre las 2 horas y las 6 horas en que se hizo

la última determinación.

La conclusión extraída de estos datos por Gundersen y Shen fué de que el equilibrio se alcanzaba entre las 4 y las 6 horas en contraste con las 2 horas observadas por Prentice y cols. (1952). Seitchick y cols. (1963) en un estudio sobre los cambios en la composición corporal durante el embarazo, con determinaciones de más larga duración, reportaron que el equilibrio se obtenía a las 10 horas en los sujetos normales.

Por otra parte Cardús, McTaggart y Young (1969) encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las estimaciones del Volumen de Agua Corporal total derivadas de la actividad de Tritio en muestras de plasma y orina recogidas a las 2 horas de la inyección intravenosa del trazador. También hubo diferencias entre las estimaciones a partir de las actividades en plasma y orina a las 4 y a las 5 horas de la inyección, aunque no tuvieron significación estadística. En dos de los siete sujetos experimentales las actividades de tritio en la orina fueron menores que las del plasma. Cardús y sus colaboradores sugirieron que la explicación a las concentraciones superiores de tritio en la orina con respecto al plasma a las 2 horas de la inyección podrían ser el resultado de fluctuaciones en el plasma durante el proceso de equilibrio con los compartimentos extravasculares, puesto que las muestras de plasma, tal como fueron recogidas, reflejaban concentra-

ciones instantáneas mientras que las muestras de orina reflejaban la integral de las fluctuaciones durante el proceso de equilibrio, al ser muestras de orina colectada en la vejiga durante un intervalo de tiempo.

Sin embargo, no pudieron ofrecer ninguna explicación al hecho de que la actividad de tritio en la orina fuese inferior a la del plasma a las 4 y 5 horas de la inyección en dos de los siete sujetos, salvo la hipótesis, que ellos mismos no consideraban plausible, de una retención selectiva de las moléculas de HTO a nivel renal.

Nosotros, estudiando la evolución de la actividad de tritio en plasma y orina tras la inyección intravenosa de una dosis de Agua Tritiada en 10 sujetos no hemos encontrado un equilibrio entre ambas actividades en las 48 horas de duración de las determinaciones, entendiendo dicho equilibrio como el momento en que las actividades del trazador en los distintos compartimentos se hacen uniformes.

En 6 de los sujetos las actividades de Tritio en orina permanecieron superiores a las del plasma durante las 48 horas de duración de la determinación, aunque la diferencia entre ambas disminuyó con el transcurso del tiempo. En los restantes 4 sujetos las actividades de Tritio en orina fueron superiores a las del plasma en las primeras horas del experimento haciéndose luego inferiores a estas.

En un modelo cinético de un compartimento abierto, la evolución de la concentración de un trazador dentro del compartimento vendrá descrita por la ecuación

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-Kt}$$

siendo $C(t)$ = Concentración del trazador a un tiempo "t"

C_0 = Concentración a tiempo cero

K = Constante de Transferencia del trazador fuera del compartimento o constante de "aclaramiento" del trazador.

La concentración del trazador en el flujo de salida del compartimento también vendrá descrita por

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-Kt}$$

En los resultados obtenidos en nuestro estudio, los valores de " C_0 " (o A_0 , puesto que los conceptos Concentración y Actividad son equivalentes) estimados a partir del comportamiento del trazador en la orina fueron superiores a los estimados a partir de su comportamiento en el plasma. Igualmente, fueron superiores los valores de " K " estimados a partir de la evolución de la actividad en orina fueron superiores a los del plasma (Tabla 15).

Si la actividad del plasma representa la actividad dentro

del compartimento y la de la orina la actividad en el flujo de salida del compartimento, esta diferencia entre ambas puede deberse a dos razones:

- 1) No se cumple una de las asunciones básicas de la Teoría de Trazadores: la de Identidad Cinética entre el Transportador y el Trazador, puesto que según ella la concentración en el flumo de salida evolucionaría igual que la concentración dentro del compartimento
- 2) El modelo cinético de un compartimento abierto no es adecuado para describir la evolución de la concentración del agua tritiada en el plasma y en la orina.

Con respecto a la Identidad Cinética entre el trazador y el Transportador, HTO y H_2O , ya expusimos en el Capítulo Primero, Apartado 3.2.1. el estado actual de conocimientos sobre este problema. Los datos aportados (Siri, 1949; Pinson, 1952; Glascock y Dunscombe, 1954; Anbar y Lewitus, 1958; Bowen, 1960; Elford, 1970) son insuficientes para poder definirse y muchas veces con
tracidorios.

Respecto a la inadecuación del modelo cinético de Un Compartimento Abierto para definir el comportamiento del Agua Tritiada en el plasma y la orina, veamos que

sucede si consideramos el espacio intraglomerular e intratubular renal como un compartimento líquido, denominado con el número 2, en comunicación con el resto del organismo⁶ como compartimento 1.

En tal sistema la actividad de Tritio en la orina representaría la actividad en el flujo de salida del compartimento 2, igual a la existente dentro del compartimento 1, si se couple la asunción de Identidad Cinética y la evolución de la actividad en el plasma refleja la evolución de la actividad en el compartimento 1. Puesto que existen otras vías de eliminación de agua además de la renal, tanto el compartimento 1 como el 2 estarían abiertos al exterior, es decir el sistema sería como el representado en la Figura 9.

La evolución del trazador en ambos compartimentos vendrá descrita por las ecuaciones

$$dC_1 / dt = -K_{12} \cdot C_1 + K_{21} \cdot C_2 - K_{1E} \cdot C_1$$

$$dC_2 / dt = K_{12} \cdot C_1 - K_{21} \cdot C_2 - K_{2E} \cdot C_2$$

cuyas soluciones son las ecuaciones 24 y 25 del Capítulo Segundo, Apartado 2.5.

En el Apartado 3.2 del mismo capítulo, demostramos que

tal sistema no puede llegar a un equilibrio puesto que para ello la transferencia neta de sustancia entre los dos compartimentos debería ser cero:

$$K_{12} \cdot C_1 = K_{21} \cdot C_2$$

Pero es evidente que $K_{12} \cdot C_1$ debe exceder a $K_{21} \cdot C_2$ en una cantidad igual a $K_{2E} \cdot C_2$, luego

$$K_{12} \cdot C_1 \neq K_{21} \cdot C_2$$

Si K_{12} fuera igual a K_{21} la concentración del trazador en el compartimento 1, C_1 , sería mayor que la concentración en el compartimento 2.

Las constantes de "aclaramiento" del trazador en cada compartimenta, disminuyendo la concentración en uno de ellos más rápidamente que en el otro (Berger y Steele, 1958).

Las ecuaciones 24 y 25 pueden usarse para calcular estos constantes de aclaramiento aunque no es este el objetivo que perseguimos ahora, sino el de demostrar que el sistema abierto de Un Compartimento es inadecuado para explicar el comportamiento del agua tritiada en el plasma y la orina en nuestros experimentos, mientras que dicho comportamiento puede ser explicado por un sistema bicompartamental abierto como el representado en la Figura 9.

Al utilizar un modelo bicompartimental abierto para explicar nuestras observaciones debíamos replantearnos la validez de nuestras estimaciones de "K", es decir, la constante de aclaramiento del trazador en la orina y el plasma, puesto que fueron obtenidas ajustando nuestros datos experimentales a una ecuación exponencial de la forma:

$$C(t) = C_0 \cdot e^{-Kt}$$

mientras que deberían ajustarse a ecuaciones biexponenciales de la forma de las ecuaciones 24 y 25.

Las determinaciones de la Actividad de Tritio en el plasma eran insuficientes para definir dos términos exponenciales, por lo que repetimos los experimentos en gatos.

En ellos encontramos que siguiendo a la inyección de agua tritiada, la actividad de tritio en plasma y orina tras alcanzar un valor máximo, disminuía exponencialmente con el tiempo. El último término exponencial aparente fué determinado por análisis gráfico, estimando despues sus parámetros por el método de los mínimos cuadrados y obteniendo así los resultados expuestos en la tabla 17.

La ordenada en el origen y la pendiente del último término exponencial de la curva de actividad de Tritio en ori-

na fueron superiores en todos los animales estudiados a sus equivalentes en el plasma, confirmando los resultados obtenidos en humanos.

A partir de las 2 a 3 horas tras la inyección, el efecto del primer (o primeros) término exponencial sobre la forma de la curva se hizo muy pequeño en relación al del último término exponencial, coincidiendo con uno de los caracteres definitorios del equilibrio descrito por Pinson y Laugham, pero dentro de los límites de sensibilidad del método analítico que utilizamos, pudimos seguir observando diferencias entre las concentraciones de agua tritiada en el plasma y la orina hasta el fin de las 7 horas de duración de los experimentos.

Cuando analizamos la evolución de la concentración de agua tritiada en el Líquido Cefalorraquídeo, en comunicación con el plasma pero no con el exterior encontramos que la ordenada en el origen y la pendiente del último término exponencial de su curva de actividad eran también diferentes de sus equivalentes en el plasma y la orina, aunque la diferencia entre su pendiente y la del plasma fué menor que la diferencia entre las pendientes del plasma y la orina.

Así pues, podemos concluir que los diferentes espacios entre los que se distribuye el Agua Corporal Total consti-

tuyen probablemente un sistema multicompartimentamental abierto, atendiendo al comportamiento del agua tritiada en dichos espacios.

En ese sistema multicompartimentamental abierto no se cumple la premisa del equilibrio entre las concentraciones del trazador en los distintos líquidos corporales, que justificaría la simplificación que supone la utilización de un modelo cinético de un compartimento para describir el comportamiento del agua tritiada en su dilución en el Volumen de Agua Corporal Total, o al menos ese equilibrio no se consigue en las 48 horas siguientes a la inyección del agua tritiada.

En estas condiciones la utilización del modelo de un compartimento abierto para describir la distribución del Agua Tritiada en el organismo conduce a las diferencias entre los valores del Volumen de Agua Corporal Total y Vida Media Biológica del HTO estimados a partir de las actividades de Tritio en plasma y en orina, que hemos recogido en la tabla 16 y que coinciden con las observadas por Gundersen y Shen (1966) y Cardús y cols. (1969). La diferencia llegó a ser en algunos de los sujetos entre un 8 y un 10% del Peso Corporal Magro.

Ello invita a dudar de la exactitud de los valores del Volumen de Agua Corporal Total obtenidos por el método

de dilución de Agua Tritiada, al menos en las formas de aplicación de dicho método utilizadas actualmente, puesto que los valores obtenidos dependen del líquido corporal en que se determine la concentración del HTO y no existe un criterio para definir cual de estos valores es el que mas se aproxima a la realidad.

Probablemente el que Prentice y cols. (1952) y Pinson y Laugham (1957) no encontraran diferencias en las actividades de tritio en plasma y orina pudo deberse a falta de exactitud o sensibilidad del método empleado que implicaba la evaporización del HTO de las muestras biológicas y la introducción del vapor de HTO en una cámara de ionización, formando parte del gas de llenado.

Para discutir por último algunas alternativas a las explicaciones propuestas diremos que no se puede descartar la posibilidad de una falta de identidad cinética entre el H_2O y HTO que, por ejemplo, mediante una tasa de difusión a través de las membranas diferente, podría servir para explicar el que, aún siendo válida la utilización de un modelo teórico unicompartmental para explicar la distribución del agua tritiada inyectada, fuera distinta la evolución de la actividad del tritio en el compartimento y en su flujo de salida.

O también podría ser el mecanismo debido al cual fueran distintas las constantes de aclaramiento del HTO en un sistema bicompartimental abierto, puesto que la teoría de trazadores solo puede señalar una diferencia entre dos tasas de transferencia intercompartimentales, pero no explicar a que se debe esa diferencia.

El hecho de que en un perro en el que se provocó la diuresis con la administración de un inhibidor de la Anhidrasa Carbónica, siguieran existiendo diferencias entre las curvas de actividad en el plasma y orina alcalina (pH 8,5-9) formada, parece hablar en contra de que el mecanismo renal de excreción de hidrogeniones tenga algo que ver en la aparición de dichas diferencias.

RESUMEN

RESUMEN

- 1.- Hemos ensayado diversas mezclas de centelleo y métodos de preparación de muestras buscando un método analítico simple y exacto para la determinación de la Actividad Absoluta de Tritio en muestras de líquidos corporales por Espectrometría de Centelleo Líquido Hemos obtenido resultados altamente satisfactorios utilizando la mezcla de centelleo "Y" descrita por White (1968) y el método de microdestilación en vacío descrito por McTaggart y Cardús (1968). Si la actividad de las muestras lo permite, pueden conseguirse resultados igualmente exactos contando pequeños volúmenes de líquidos corporales con la mezcla de centelleo "Y" de White sin ningún tipo de preparación previa.
- 2.- Utilizando dicho método analítico hemos estudiado la cinética de distribución en el organismo de una dosis de Agua Tritiada inyectada por vía intravenosa en un grupo de diez varones jóvenes, determinando sus concentraciones en orina y en plasma durante un período de 48 horas después de la inyección.

3.- Las Actividades de Tritio en orina y plasma decrecieron con el transcurso del tiempo a partir de los valores hallados en las primeras determinaciones. En seis de los sujetos estudiados las Actividades de Tritio en orina fueron superiores a las del plasma durante las 48 horas de duración del experimento. En los cuatro sujetos restantes la Actividad en orina, inicialmente mayor, llegó a ser menor que la Actividad en plasma en las determinaciones efectuadas en las últimas horas del experimento. En todos los sujetos el decrecimiento de la Actividad de Tritio en la Orina fué más rápido que en el Plasma.

4.- Las Ecuaciones Exponenciales ajustadas a las curvas de Actividad de orina por el método de los mínimos cuadrados tuvieron, consecuentemente, una ordenada en el origen y un período mayores que los de las Ecuaciones Exponenciales ajustadas a las curvas de Actividad en plasma. Ello se tradujo en diferencias entre los valores del Volumen de Agua Corporal Total estimados a partir de las Actividades en orina y en plasma en un mismo sujeto. Estas diferencias representaron en algunos casos entre un 8 y un 10% del Peso Corporal Magro. Asimismo aparecieron diferen-

cias entre los Tiempos de Vida Media Biológica del Agua Tritiada, expresión del recambio hídrico, estimados a partir de Actividades en Orina y Plasma, existiendo una diferencia, estadísticamente significativa a un nivel de probabilidad $p < 0,025$, entre los promedios para los 10 sujetos en dichos tiempos.

5.- El modelo cinético utilizado para estudiar la distribución del Agua Tritiada en el organismo es el de Un Compartimento Abierto, bajo la premisa de que las concentraciones de Agua Tritiada en los distintos líquidos corporales alcanzan un equilibrio entre 2 y 2 horas 30 minutos después de la inyección, lo que permite simplificar el sistema multicompartimental formado por los diversos espacios en que se distribuye el agua corporal, al modelo citado.

6.- Si existe una identidad cinética entre el agua y el agua tritiada, asunción aún no plenamente comprobada, las curvas de Actividad de Tritio en orina y plasma encontradas en nuestros sujetos, no pueden ser explicadas por el modelo de Un Compartimento Abierto pero sí, por un modelo Bicompartimental Abierto por los dos compartimentos. Las mismas conclusiones

se obtuvieron en un estudio de la cinética de la distribución del Agua Tritiada en el gato.

- 7.- El modelo cinético de Un Compartimento Abierto tampoco puede explicar el hecho, constatando experimentalmente, que la curva de Actividad de Tritio en el Líquido Cefalorraquídeo también fuese diferente de las correspondientes a orina y plasma.
- 8.- Al no cumplirse la premisa de establecimiento de un equilibrio entre las concentraciones del trazador en los distintos líquidos corporales (al menos en el tiempo de duración de nuestros experimentos) y al no poder explicar las curvas de Actividad observadas en dichos líquidos, el modelo teórico de Un Compartimento Abierto es inadecuado para el estudio de la cinética de distribución corporal del Agua Tritiada.
- 9.- Al basarse en un modelo cinético inadecuado, está justificado dudar de la exactitud de los valores del Volumen de Agua Corporal Total estimados por dilución de Agua Tritiada en la forma en que viene usándose dicho método, toda vez que los resultados varían según sean estimados a partir de la evolución de la

Actividad de Tritio en uno u otro líquido corporal y que no se tiene un criterio seguro para establecer cual de los valores se aproxima más a la realidad.

BIBLIOGRAFIA

- ABRAMS, M.E.
Medical computing-progress and problems
Chatto & Windus ; London, 1959.
- ADDANKI, S.; DALLAS, F. & SOTOS, J.F.
A method for the determination of extracellular
space with ^3H -Inulin
Clin. Chem. : 13, 953, 1967
- AGNA, J.W.; KNOWLES, H.C. & ALVERSON G.
The mineral content of normal human bone
J. Clin. Invest. : 37, 1357, 1958
- AGRANOFF, B.W.
Silica vials improve low level counting
Nucleonics : 15, 106, 1957
- ALTMAN, P.L. & DITTMER, D.S. (eds.)
Biological Handbooks : Blood and other body fluids
Federation of American Societies for Experimental
Biology ; Washington D.C., 1961
- ANBAR, M. & LEWITUS, Z.
Rate of body water distribution studied with
triple labelled water
Nature : 181, 344, 1958
- ASCHBACHER, P.W.
Total body water estimations in dairy cattle
using tritiated water
J. Anim. Sci. : 24, 430, 1965
- ATKINS, G.L.
Multicompartment models for biological systems
Methuen; London, 1969
- BAILLIE, L.A.
Determination of liquid scintillation counting
efficiency by pulse heights shift
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 8, 1, 1960
- BARON, D.N. & AHMED, S.A.
Intracellular concentrations of water and of prin
cipal electrolytes determined by analysis of iso
lated human leucocytes
Clin. Sci. : 37, 205, 1969

- BARRATT, T.M. & WALSER M.
Extracellular volume in skeletal muscle of the rat and dog : A comparison of radiosulphate and radiobromide spaces
Clin. Sci. : 35, 525, 1968
- BARRATT, T.M. & WALSER, M.
Extracellular fluid in individual tissues and in whole animals : The distribution of radiosulphate and radiobromide
J. Clin. Invest. : 48, 56, 1969
- BEHNKE, A.R.
Physiologic studies pertaining to deep sea diving and aviation, especially in relation to the fat content and composition of the body
En : "Harvey Lectures, series 37, p. 198; Charles C. Thomas Publisher, Springfield, Ill, 1941-42"
- BEHNKE A.R.
Anthropometric evaluation of body composition through life
Ann. N.Y. Acad. Sci. : 110, 113, 1963
- BELL, C.G. & HAYES, F.N. (eds.)
Liquid scintillation counting
Pergamon Press Inc.; New York, 1958
- BERGER, E.Y.; DUNNING, M.F.; STEELE, J.M.; RACKENTHAL R. & BRODIE, B.B.
Estimation of intracellular water in man
Am. J. Physiol. : 162, 318, 1950
- BERGER, E.Y.; STEELE, J.M.
The calculation of transfer water in two compartments not in dynamic equilibrium
J. Gen. Physiol.: 41, 1135, 1958
- BERGNER, P.E.E.
Dynamic aspects of method in tracer kinetics
Exp. Cell. Res. : 17, 328, 1959
- BERGNER, P.E.E.
On the solution of the compartmentalized tracer system
Exp. Cell. Res. : 20, 579, 1960
- BERGNER, P.E.E. & LUSHBAUGH, C.C. (eds.)
Compartments, pools and spaces in Medical Physiology
U.S.A.E.C., Div. Techn. Inform., U.S. Dpt. Commerce, Springfield; Virginia, 1967

- BERGSTROM, W.H. & WALLACE W.M.
Bone as a sodium and potassium reservoir
J. Clin. Invest. : 33, 867, 1954
- BERLIN, N.I.; BERMAN, M.; BERK, P.O.; PHANG, J.M. & WALDMANN, T.A.
The application of multicompartmental analysis to problems of Clinical Medicine
Ann. Int. Med. : 68, 423, 1968
- BERMAN, M. & SCHOENFELD R.
Invariants in experimental data on linear kinetics and the formulation of models
J. Appl. Phys. : 27, 361, 1956
- BERMAN, M. & SCHOENFELD, R.
A note on unique models in tracer kinetics
Exp. Cell. Res. : 20, 574, 1960
- BERMAN, M.; SHAHN, E. & WEISS, M.
A computer program for the fitting of data to a model
5th National Biophysics Society Meeting; St.Louis Feb, 1961
- BERSON, S.A.
Blood volume in health and disease
Bull. N.Y. Acad. Med. : 30, 750, 1954
- BIRKENFELD, L.W.; LEIBMAN, J.; O'MEARA, M.P. & EDELMAN I.S.
Total exchangeable sodium, total exchangeable potassium and total body water in edematous patients with cirrhosis of the liver and congestive heart failure
J. Clin. Invest. : 37, 687, 1958
- BIRKS, J.B.
The theory and practice of scintillation counting
Pergamon Press Inc.; New York, 1964
- BISCHOFF, E.
Einige Gewichts und Trocken-Bestimmungen der Organe des Menschlichen Körpers
Zschr. Rat. Med. : 20, 75, 1863
- BISCHOFF, K.B. & DEDRICK, R.L.
Generalized solution to linear two compartment open model for drug distribution
J. Theoret. Biol. : 29, 63, 1970

- BLAND, J.H.
Clinical metabolism of body water and electrolytes
W.B. Saunders Co.; Philadelphia and London, 1963
- BLESSER, W.B.
A system approach to Biomedicine
McGraw Hill, Inc.; New York, 1969
- BOJESSEN, E.
A method for determination for inuline in plasma and urine
Acta Med. Scand. Suppl. 266, 275, 1952
- BOWEN, H.J.M.
Biological fractionation of isotopes
Int. J. Appl. Rad. Isotopes : 7, 261, 1960
- BRADBURY, M.B.W.; STUBBS, J. & HUGHES, I.E
The distribution of potassium, sodium, chloride and urea between lumbar CSF and blood serum in human subjects
Clin. Sci. : 25, 97, 1963
- BRAY, G.A.
A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter
Anal. Biochem. : 1, 279, 1960
- BRINER, W.H.
The preparation of radioactive chemicals for clinical use
Amer. J. Hosp. Pharm. : 20, 553, 1963
- BRODIE, B.B.; BRAND, E. & LESHIN, S.
The use of bromide as a measure of extracellular fluid
J. Biol. Chem. : 130, 555, 1939
- BRODIE, B.B.; BERGER, E.Y.; AXELROD, J.; DUNNING, M.F.; POROSOWSKA, Y. & STEELE, J.M.
Use of N-acetyl 4-aminoantipyrine (NAAP) in measurement of total body water
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. : 77, 794, 1951
- BROWNELL, G.L.; BERMAN, M. & ROBERTSON, J.S.
Nomenclature for tracer kinetics
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 19, 249, 1968

- BROZEK, J.
Body measurements including skinfold thickness
and indicators of body composition
En "Techniques for measuring body composition,
Brozek J. y A Henschel, eds., p.3 ; Nat. Acad.
Sci., Nat. Res. Council ; Washington D.C., 1961"
- BROZEK, J. & KEYS A.
The evaluation of leanness-fatness in man : norms
and interrelationships
Brit. J. Nutr. : 5, 194, 1951
- BRUES, A.M.; STROUD, A.N. & RIETZ, L.
Toxicity of HTO to mice
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. : 79, 174, 1952
- BUSH, E.T.
General applicability of the channels ratio
method of measuring liquid scintillation count
ing efficienc^yies
Anal. Chem. : 35, 1024, 1963
- BUSH, E.T.
Liquid scintillation counting of doubly-labelled
samples. Choice of counting conditions for best
precision in two channel counting
Anal. Chem. : 36, 1082, 1964
- BUTLER, F.E.
IAEA..Symp. Assesment Radioactivity Man
Vol II, p. 431; Vienna, 1964
- BUTLER, F.E.
Determination of tritium in water and urine
Liquid scintillation counting and rate-of-drift
determination
Anal. Chem. : 33, 409, 1961
- CALCAGNO, P.L.; HUSSON, G.S. & RUBIN, M.I.
Measurements of extracellular fluid space in
infants by equilibration technique using inulin
and sodium ferrocyanide
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. : 77, 309, 1951
- CAMPBELL, I.G.; WHITE, D.F. & PAYNE, P.R.
Citado por Pinson (1952)
Brit. J. Radiol. : 24, 682, 1951
- CAMERER, W.; SÖLDNER, P. & HERZOG, H.
Die chemische Zusammensetzung des Neugeborenen
Ztschr. f. Biol. : 43, 1, 1902

- CARDUS, D.; McTAGGART, W.G. & YOUNG, L.C.
Effect of exercise on determination of total
body water by tritium oxide
J. Appl. Physiol. : 27, 1, 1969
- CATCH, J.R.
Radioisotopes as tracers : the rational approach
Research : 9, 479, 1956
- CIZEK, L.J.
Total water content of laboratory animals with
special reference to volumen of fluid within
the lumen of the gastrointestinal tract
Amer. J. Physiol. : 179, 104, 1954
- CLELAND, J.; PLUTH, J.R.; TAUXE, W.N. & KIRKLIN, J.W.
Blood volume and body fluid compartment changes
soon after closed and open intracardiac surgery
J. Thorac. Cardio. Surg. : 52, 698, 1966
- COMAR, C.L.
Radioisotopes in Biology and Agriculture
McGraw-Hill; New York, 1955
- COOPER, J.A.; RADIN, N.S. & BORDEN, C.
A new technique for simultaneous estimation of
total body water and total exchangeable body
sodium using radioactive tracers
J. Lab. Clin. Med. : 52, 129, 1958
- CORNELL, R.G.
A method for fitting linear combination of
exponentials
Biometrics : 3, 104, 1962
- CORNFIELD, J.; STEINFELD, J. & GREENHOUSE, S.W.
Models for the interpretation of experiments
using tracer compounds
Biometrics : 16, 212, 1960
- COTLOVE, E.
Mechanism and extent of distribution of inulin
and sucrose in chloride space of tissues
Amer. J. Physiol. : 170, 396, 1954
- COWGILL, G.R.
A formula for estimating the specific gravity
of the human body with a consideration of its
possible
Uses. Am. J. Clin. Nutr. : 5, 601, 1957

- CRANDALL, L.A. & ANDERSON, M.
 Estimation of the state of hydratation of body
 by amount of water available for solution of so-
 dium thyocyanate
 Am. J. Digest. Dis. Nutr. : 1, 126, 1934
- CRONE, C.
 The penetration of inulin, sucrose, mannitol and
 tritiated water from the interstitial space in
 muscle into the vascular system
 J. Physiol.: 210, 387, 1970
- CHAUDHURI, B.N. & YADAV, H.S.
 A simplified method for the measurement of ^3H ,
 ^{14}C , and ^{45}Ca concentrations in blood plasma
 Ind. J. Med. Res. : 57, 1, 1969
- CHEEK, D.B.; MELLITS, D. & ELLIOT, D.
 Body water, height and weight during growth in
 normal children
 Amer. J. Dis. Child. : 112, 312, 1966
- CHEN, P.S.
 Liquid scintillation counting of ^{14}C and ^3H in
 plasma and serum
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med. : 98, 546, 1958
- CHIEVITZ, O & HEVESY, G.
 The distribution in the body of radioactive
 phosphor
 Nature : 136, 754, 1935
- CHINARD, F.B.; EFFROS, R.; PERL, W. & SILVERMAN M.
 Organ vascular and extravascular compartments
 in vivo
 En: " Compartments pools and spaces in Medical
 Physiology , Bergner y Lushbaugh (eds), 1967
- DAVIDSON, J.D. & FEIGELSON, P.
 Practical aspects of internal-sample liquid
 scintillation counting
 Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 2, 1, 1957
- DAGHER, F.D.; LYONS, J.M.; FINLAYSON, D.C.; SHAMSAI, J.
 & MOORE, F.D.
 Blood volume measure : A critical study predic-
 tion of normal values. Controlled measurement
 of sequential changes : Choice of a bedside
 method
 Advances in Surg. : 1, 69, 1965

- DEANE, N.
Intracellular water in man
J. Clin. Invest. : 30, 1469, 1951
- DEANE, N.
Citado por Altman & Dittmer (1961)
Meth. M. Res. : 5, 159, 1952
- DEANE, N.
The distribution of sodium and potassium in man
J. Clin. Invest. : 31, 197, 1952
- DEGROSSI, O.
Determinations of total body water by means of tritium
Rev. Clin. Esp. : 27, 403, 1965
- DELONG, C.W.; THOMPSON, R.C. & KORNBERG, H.A.
Exposure to tritiated water vapour
Am. J. Roentgenol. : 71, 1038, 1951
- DEMING, W.E.
Statistical adjustment of data
John Wiley & Sons Inc.; N.Y., 1943
- DEWACHTER, R & FIER, W.
External standardization in liquid scintillation counting of homogeneous samples labelled with one, two or three isotopes
Anal. Biochem. : 18, 351, 1967
- DICKINSON, C.J.
A digital computer model of the systemic circulation and kidney for studying renal and circulatory interactions involving electrolytes and body fluids compartments
- DIXON, W.J. (ed.)
BMD, Biomedical Computer Programs X-series Supplement
Univ. California Press; Berkeley, 1970
- DOBBS, H.E.
Measurement of liquid scintillation counting efficiencies.
Nature : 200, 1283, 1963
- DOBBS, H.E.
Measurement of tritium in heterogeneous and homogeneous counting systems
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 19, 155, 1968

- EARLY, R.G.; CARLSON, B.R. & CASNER, S.W.
Measured specific gravity, predicted specific gravity and total body water relationships in normal young men
Int. Z. Angew. Physiol. : 28, 79, 1970
- EDELMAN, I.S.
Exchange of water between blood and tissues : Characteristics of deuterium oxide equilibrium in body water
Amer. J. Physiol. : 171, 279, 1952
- EDELMAN, I.S.; HALEY, H.B.; SCHLOERB, P.R.; SHELDON, D.B. FRIK-HANSEN, B.J.; STOLL, G. & MOORE, F.D.
Further observations on total body water : I Normal values throughout the life-span
Surg. Gyn. Obst. : 95, 1, 1952
- EDELMAN, I.S.; OLNEY, J.M.; JAMES, A.H.; BROOKS, L. & MOORE, F.D.
Body composition : Studies in the human being by the dilution principle
Science : 115, 447, 1952
- EDELMAN, I.S.; JAMES, A.H.; BADEN, H. & MOORE, F.D.
Electrolyte composition of bone and the penetration of radiosodium and D2O into dog and human bone
J. Clin. Invest. : 33, 122, 1954
- EDELMAN, I.S.; EIBMAN, J.; O'MEARA, M.P. & BIRKENFELD, L.
Interrelation between sodium concentration, serum osmolarity and total exchangeable sodium, total exchangeable potassium and total body water
J. Clin. Invest. : 36, 1236, 1958
- EDELMAN, I.S. & LEIBMAN, J.
Anatomy of body water and electrolytes
Amer. J. Med. : 27, 256, 1959
- ELFORD, B.C.
Permeation and distribution of deuterated and tritiated water in smooth and striated muscle
J. Physiol. : 211, 73, 1970
- ELKINTON, J.R.
Water metabolism
Ann. Rev. Physiol. : 12, 145, 1950
- ENGLAND, J.M. & MILLER, R.G.
Counting times in the measurement of radioactivity
Int. J. Appl. Isotopes : 20, 1, 1969

- EVERT, C.F. & RANDALL, M.J.
Formulation and computation of compartment models
J. Pharm. Sciences : 59, 403, 1970
- FALLER, I.L.; BOND, E.E.; PETTY, D. & PASCALE, L.R.
The use of urinary deuterium oxide concentrations in a simple method for measuring total body water
J. Lab. Clin. Med. : 45, 759, 1955
- FALLER, I.L.; PETTY, D.; LAST, J.H.; PASCALE, L.R. & BOND, E.E.
A comparison of the D2O and antipyrine solution methods for measuring total body water in normal anhydrotic human subjects
J. Lab. Clin. Med. : 45, 748, 1955
- FALLOT, P.; AEBERHARDT, A. & MASSON, J.
Méthode de dosage de l'eau tritiée et ses applications à la clinique humaine
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 1, 237, 1957
- FERGUSON, D.R.
Water transfer across membranes
J. Endocrinol. : 50, 8, 1971
- FERRARIO, C.M.; FERNANDEZ, L.A. & MEJIA, R.H.
Analysis of tracer dilution curves
Acta Physiol. Latinoamer. : 18, 223, 1968
- FISH, B.R.
Applications of an analog computer to analysis of distribution and excretion data
Health Phys. : 1, 276, 1959
- FLEAR, C.T.G.; FLORENCE, I. & WILLIAMS, J.A.
Water, sodium, potassium and chloride content of skeletal muscle in fit and ill subjects
J. Clin. Path. : 21, 555, 1968
- FLEXNER, L.B.; WILDE, W.S.; PROCTOR, N.K.; COWIE, D.B.; VOSBURGH, G.H. & HELLMAN, L.M.
J. Pediat. St. Louis : 30, 413, 1947
- FORBES, G.B. & LEWIS, A.M.
Total sodium, potassium and chloride in adult man
J. Clin. Invest. : 35, 596, 1956
- FOX, F.W.
The application of Triton X-100 colloid scintillation counting in Biochemistry
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 19, 717, 1968

- FOY, J.M.
Citado por Moore (1968)
J. Cell. Comp. Physiol. : 64, 279, 1964
- FOY, J.M. & SCHNIEDEN, H.
Estimation of total body water virtual tritium space in the rat, cat, rabbit, guinea-pig and man and of the biological half-life of tritium in man
J. Physiol. : 154, 169, 1960
- FRIIS-HANSEN, B.J.; HOLIDAY, M. & STAPLETON, T.
Total body water in children
Amer. J. Dis. Child : 80, 515, 1950
- FRIIS-HANSEN, B.J.; HOLIDAY, M.; STAPLETON, T. & WALLACE, W.M.
Total body water in children
Pediatrics : 7, 321, 1951
- FRIIS-HANSEN, B.J.
Changes in body water compartment during growth
Acta paediat., Upps. v. 46, suppl. 110, 1957
- FUNT, B.L. & HETHERINGTON, A.
The kinetics of quenching in liquid scintillators
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes, : 13, 215, 1962
- FURST, M. & KALLMANN, H.
Concentration quenching of liquid scintillators
En "Liquid Scintillation Counting; Pergamon Press Inc.; New York, 1958"
- FURST, M.; KALLMAN, M. & BROWN, F.H.
Increasing fluorescence efficiency of liquid scintillation solutions
Nucleonics : 13, 58, 1955
- FURST, M. & KALLMAN, H.
High energy induced fluorescence in organic liquid solutions (Energy transport in liquids, Part III)
Phys. Rev. : 85, 816, 1952
- GAMBLE, J.L.
Companioship of water and electrolytes in the organization of body fluids
Lane Med. Lect. Stanford Univ.Press, 1951
- GAMBLE, J.L.; ROBERTSON, J.S.; HANNIGAN, C.A.; FOSTER, C.G. & FARR, L.E.
Chloride , Bromide, sodium and sucrose space in man
J. Clin. Invest. : 32, 483, 1953

- GARDNER, D.G.; GARDNER, J.C.; LAUSH, G. & MEINKE, W.W.
Method for the analysis of multicomponent exponential decay curves
J. Chem. Phys.: 31, 978, 1959
- GAUDINO, M.; SCHWARTZ, I.L. & LEVITT, M.P.
Inulin volume of distribution as a measure of extracellular fluid in dog and man
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. : 68, 507, 1948
- GIBSON, J.A.B. & LALLY, A.T.
Liquid scintillation counting as an analytical tool
Analyst : 96, 681, 1971
- GILMAN, A.; PHILLIPS, F.S. & KOELLE, E.S.
Renal clearance of thiosulphate with observations on its volume distribution
Amer. J. Physiol. : 146, 348, 1946
- GIVENS, M.H. & MACY, I.G.
J. Biol. Chem.: 102, 7, 1933
- GLASCOCK, R.F. & DUNSCOMBE, W.G.
Differential fractionation of hydrogen isotopes in liver and mammary gland
Biochem. J. : 58, 440, 1954
- GOTCH, F.; NADELL, J. & EDELMAN, I.S.
Gastrointestinal water and electrolytes .IV The equilibrium of D2O in gastrointestinal contents and the proportion of total body water in the gastrointestinal tract.
J. Clin. Invest. : 36, 289, 1957
- GRAHAM, J.A.; LAMB, J.F. & LINTON, A.L.
Measurement of body water and intracellular electrolytes by means of muscle biopsy
J. Lab. Clin. Med. : 70, 938, 1967
- GRAY, L.H.
General principles of assay and standardization of radioactive isotopes
British Med. Bull.: 8, 115, 1952
- GRAY, A.L. & LOOSEMORE, W.R.
Radiation Detectors, Parts I to IV
Nuclear Power : 4, 34: 74, 1959; 36: 97, 1959
37: 103, 1959; 38: 112, 1959
- GREGERSEN, M.I. & FAWSON, R.A.
Blood volume
Physiol. Rev. : 39, 307, 1959

- HANSEN, D.L. & BUSH, E.T.
Improved solubilization procedures for liquid scintillation counting of biological materials. Anal. Biochem. : 18, 320, 1967
- HANSEN, D.L. & CARROLL, C.O.
Computerized Assay of Doubly Labeled Liquid Scintillation Samples. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 22, 677, 1971
- HARDY, J.D. & DRABKIN, D.L.
The D₂O Dilution Space as a Measure of Total Body Water² and the relation of Body Water to Body Size. Amer. J. Med. Sc. : 219, 108, 1950
- HARDY, J.D.; SEN, P.K. & DRABKIN, D.L.
The relation of Body Fluid Compartments to Body Fat. Surg. Gyn. Obst. : 93, 103, 1951
- HARDY, J.D. & DRABKIN, D.L.
Measurement of Body Water: Techniques and Implications. J.A.M.A.; 149, 1113, 1952
- HART, H.E.
Analysis of Tracer Experiments II: Non-conservative, non-steady-state systems. Bull. Math. Biophys. : 19, 61, 1957
- HASTINGS, A.B.
The Electrolytes of Tissues and Body Fluids. Harvey Lect. p. 91, 1940-1941
- HAYES, F.N., ROGERS, B.S. & SANDERS, P.C.
Importance of solvent in liquid scintillators. Nucleonics : 13, 46, 1955
- HAYES, F.N.
Liquid Scintillators: Attributes and Applications. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 1, 46, 1956
- HAYES, F.N.
Liquid solution scintillators. Los Alamos Scientific Laboratory Report L.A. - 1639, 1953
- HEARON, J.Z.
Interpretation of Tracer Data. Biophys. J. : 9, 1363, 1969
- HERBERG, R.V.
Channels ratio method of Quenching Correction in Liquid Scintillation Counting. Packard Tech. Bull. No 15, Dec. 1965

- HERBERG, R.V.
Background for Liquid Scintillation Counting of Colored Solutions. Anal. Chem. : 32, 1468, 1960
- HERBERG, R.V.
Phosphorescence in Liquid Scintillation Counting of Proteins. Science : 128, 199, 1958
- HEVESY, G.
Radioactive Indicators. Interscience : New York, 1948
- HEVESY, G. & HOFER, E.
Die verweilzeit des Wassers in menschlichen Körper, untersucht mit Hilfe von "schwerem" Wasser als Indikator. Klin. Wchnschr. : 13, 1524, 1934
- HEVESY, G.
Historical Progress of the Isotopic Methodology and its Influences on the Biological Sciences. Minerva Nucleare : 1, 182, 1957
- HEVESY, G. & HOFER, E.
Measurement of TBW with Heavy Water. Nature : 134, 879, 1934
- HEVESY, G. & JACOBSON, C.F.
Acta Physiol. Scand. : 1, 11, 1940 (Citado por Pinson y Langham, 1952)
- HINE, G.J. (ed.)
Instrumentation in Nuclear Medicine. Vol. 1, Academic Press, New York, 1967
- HIGASHIMURA, T.; YAMADA, O.; NOHARA, N. & SHIDEI, T.
External Standard Method for the Determination of the Efficiency in Liquid Scintillation Counting. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes.: 13, 308, 1962
- HOLLANDER, V.; CHANG, P. & COTUI, F.W.
J. Lab. Clin. Med. : 34, 680, 1949
- HORROCKS, D.L.
Measurement of Samples Quenching of Liquid Scintillator Solutions with X-Ray and Gamma-Ray Sources. Nature : 202, 78, 1964
- HOWE, C.T., EKINS, R.P.
The Bromide Space after the Intravenous Administration of 82-Br. J. Nucl. Med.: 4, 469, 1963

- GREGG, E.C.
An analogue computer for the generalized three compartment model of transport in biological systems
Western. Reserve Univ. Report N.Y.2906, Dec. 1959
- GROWER, M.F. & BRANSOME, E.D.
The current status of liquid scintillation counting
Grune and Stratton; London, 1970
- GRUNNER, O.
Klin. Wschr. : 35, 347, 1957
- GUINN, V.P. & WAGNER, C.D.
A comparison of ionization chamber and liquid scintillation methods for measurements of beta-emitters
Atomlight, 12, 1960
- GUMPERT, G.R.W.; NIGRO, M. & ZOLLINGER, R.M.
Br⁸² distributional kinetics between plasma and thoracic duct lymph in man
Fed. Proc. April, 1968
- GUNDERSEN, K. & SHEN, G.
Total body water in obesity
Amer. J. Clin. Nutr. : 19, 77, 1966
- HALEY, H.G. & WOODBURY, J.W.
Observations on body composition and body water metabolism in normal pregnancy
- HALEY, H.B.; EDELMAN, I.S.; FREDERICKSON, D.S. & MOORE F.D.
Water balance and electrolytes. An effect of thyroid disease on water turnover rate in the human subject p.543
Surg. Forum, Amer. Coll. Surg.; W.B. Saunders & Co.; Philadelphia, 1953
- HANSARD, S.L.
Total body water in farm animals
Amer. J. Physiol. : 206, 1369, 1964
- HANSEN, D.L. & BUSH, E.T.
Improved solubilization procedures for liquid scintillation counting of biological materials
Anal. Biochem. : 18, 320, 1967

- HURST, W.W. & SHERUM, F.R.
 Truce Hanlons Determination of Total Body Water
 by Sutipynus and D₂O in Patients with Edema.
 Am. J. Med. : 10, 516, 1951
- HUTCHINSON, D.L.; PLENTIL, A.A. & TAYLOR, H.C.
 The Total Body Water and the Water Turnover in
 Pregnancy Studied with D₂O as Isotopic Tracer.
 J. Clin. Invest. : 33, 235, 1954
- HYTTEN, F.E. & THOMSON, A.M.
 Water and Electrolytes in Pregnancy. Brit. Med.
 Bull. : 24, 15, 1968
- IOB, W & SWANSON, W.N.
 Mineral growth of the human fetus. Am. J. Dis.
 Child : 47, 302, 1934
- IKKOS, D.E.; LUFT, R. & SJORGREN, B.
 Distribution of fluid and sodium in healthy a-
 dults. Metabolism : 3, 400, 1954
- JAFFEE, M. & FORD, L.A.
 On the nature of quenching. Int. J. Appl. Rad.
 Isotopes : 21, 49, 1970
- JAFFEE, M. & FORD, L.A.
 Color Quenching. Am. Nucl. Soc. : 8, 318, 1966
- I.A.E.A.
 Radioisotope sample measurements in medicine and
 biology. Proceedings of the symposium on radio-
 isotope measurement techniques in medicine and
 biology held by the Intl. Atomic Energy Agency
 in Viena, 24-28 May 1965,
- KAMEN, M.D.
 Radioactive tracers in Biology. Acad. Press :
 N.Y. 1948
- KALLMAN, H. & FURST, M.
 The basic processes occurring in the liquid scin-
 tillator, in BELL & HAYES ref. ___, pp. 3-22
- KALLMAN, H. & FURST, M.
 Fluorescence of solutions bombarded with high
 energy radiation (Energy transport in liquids).
 Part II Phys. Rev. : 79, 857, 1956
- KAVALER, F.
 Radiosulfate space in tissues. Fed. Proc. :
15, 107, 1956

- KEITH, N.H.; ROWNTREE, L.G. & GERAGHTY, J.T.
A method for the determination of plasma and blood volume. Arch. Internal Med. : 16, 547, 1915
- KERR, V.N.; HAYES, F.N. & OTT, D.G.
Liquid scintillators: III The quenching of liquid scintillator solution by organic compounds. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 1, 284, 1957
- KEYS, A. & BROZEK, J.
Body fat in adult man. Physiol. Rev. : 33, 245, 1953
- KINDLER, E.
MINICOSMO: Universal generator of steady state compartmental system models. Acta Univ. Carol. (Med): Praha, 16, 281, 1970
- KINSEY, V.E.; GRANT, M. & COGAN, D.G.
Arch. Opth. : 27, 242, 1942
- KLEEMAN, C.R.; EPSTEIN, F.H.; RUBIN, M.F. & LAMDIN, E.
Initial distribution and fate of fenocyanide in dogs. Amer. J. Digest. Dis. : 182, 548, 1955
- KLEEMAN, N. & FICHMAN, E.
The clinical physiology of water metabolism. N.E. J. Med. : 277, 1300, 1967
- KLEIBER, M.
Meaning of turnover in Biochemistry. Nature : 175, 342, 1955
- KLOSE, E.
Jahrb. Kinderh. : 80, 154, 1914
- KNISELEY, R.M.; TAUXE, W.N. (eds.)
Dynamic Clinical Studies with Radioisotopes. U.S.A.E.C., Div. Techn. Inform., U.S. Dpt. Commerce Springfield, Virginia, 1964
- KREBS, H.A.
Measurement of turnover rate of steady-state systems in living tissues. Radioisotope Techniques. Her Majesty's Stat. Off. London, 1953
- KRAGELUND, E. & DYRBYE, M.
Direct liquid scintillation counting of biological fluids. Scand. J. Clin. Lab. Invest. : 19, 129, 1966

- KRUHØFFER, P.
Inulin as an indicator for the extracellular space.
Acta Physiol. Scand. : 11, 16, 1946
- LAMBERT, B.E.; HEATHER, B.; SHARPE, A. & DAWSON, K.B.
An accidental intake of Tritiated water. Amer. Ind.
Hyg. Assoc. J. : 32, 682, 1971
- LANGHAM, W.H.; EVERSOLE, W.J.; HAYES, F.N. & TRUJILLO, T.T.
Assay of tritium activity in body fluids with use of
a liquid scintillation system. J. Lab. Clin. Med. :
47, 819, 1956
- LANGSTEIN, L. & EDELSTEIN, F.
Zschr. Kinderh. : 15, 49, 1917
- LAVIETES, P.H.; BOURDILLON, J. & KLINGHOFFER, K.A.
The volume of the extracellular fluids of the body.
J. Clin. Invest. : 15, 261, 1936
- LAWSON, H.C.
The volume of blood-a critical examination of methods
for its measurement. Handbook of Physiology, W.F.
Hamilton and P. Dow (eds.); Vol.1, sect. 2, chap. 3
p. 23, Amer. Physiol. Society, Wash. D.C., 1962
- LAX, L.C.S.; SIDLOFSKY, S. & WRENSHALL, G.A.
Compartmental contents and simultaneous transfer rates
of phosphorus in the rat. J. Physiol. : 132, 1, 1956
- LAX, L.C.S. & WRENSHALL, G.A.
Measurement of turnover rates in systems of hydrody-
namic pools out of dynamic equilibrium. Nucleonics, :
11, 18, 1953
- LEAF, A.
Regulation of intracellular fluid volume and disease.
Am. J. Med. : 49, 291, 1970
- LEIBMAN, J.; GOTCH, F.A. & EDELMAN, I.S.
Tritium assay by liquid scintillation spectrometry.
Comparison of HTO and D₂O as tracers for body water.
Circulat. Resp. : 8, 907, 1960
- LEONARD, P.J.; BLACKMAN, V. & JONES, K.W.
Total Body Water, ECF, Plasma volume and red cell
mass in healthy East African. Clin. Sci. : 29, 427,
1965
- LIGHTFOOT, L.H. & COOLIDGE, T.B.
The distribution of collagen in the guinea pig. J.
Biol. Chem. : 176, 477, 1948

- LINDSAY, P.A. & KURNICK, N.B.
Preparation of tissues for liquid scintillation radio-activity counting. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 20, 97, 1969
- LITCHFIELD, J.A. & GADDIE, R.
The measurement of the phase distribution of water and electrolytes in skeletal muscles by the analysis of small samples. Clin. Sci. : 17, 483, 1958
- LITTLE, R.L.
The current status of liquid scintillation counting. p.371, Grune and Stratton, London, 1970
- LONDON, J.M. & RITTENBERG, I.
J. Biol. Chem. : 184, 687, 1950
- LOO, J.C.K. & RIEGELMAN, S.
Assessment of pharmacokinetic constants from post-infusion blood curves obtained after I.V. infusion. J. Pharm. Sci. : 59, 53, 1970
- LUPS, S. & HAAN, A.M.F.H.
The Cerebrospinal Fluid. Elsevier Press, Amsterdam, 1954
- MACDONALD, J.R.; PERRY, E.G.; MADISON, L.L. & SELDEN, D.W.
An electrical analogue for analysis of tracer distribution kinetics in biological systems. Radiat. Res. : 6, 585, 1957
- MANERY, J.F.
Water and electrolyte metabolism. Physiol. Rev.: 34, 334, 1954
- MANERY, J.F. & HASTINGS, A.B.
The distribution of electrolytes in mammalian tissues. J. Biol. Chem. : 127, 657, 1939
- MANN, W.B. & GARFINKEL, S.B.
Radioactivity and its measurement. Van Nostrand, Princeton, N.J., 1966
- MCCANCE, R.A. & WIDDOWSON, E.M.
A method of breaking down the body weights of living persons into terms of extracellular fluid cell mass and fat and some applications to physiology and medicine.
- MCTAGGART, W.G. & CARDUS, D.
A technique for determining total body water using Tritium Oxide. Comunicacion Personal, 1968

- MEADE, R.C. & SIGLITZ, R.A.
Chloride of Hyamine 10-X in the LSC counting of biological fluids. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes, : 13, 11, 1962
- MELBIN, J.
A general approach for computation and interpretation of dilution curves. Bio.Med. Eng. : 14, 244, 1967
- MESSINGER, W.J. & STEER, J.M.
Relationship of Body Specific Gravity to Body Fat and Water Content. Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y.: 70, 316, 1949
- MICHEL, C.
Citado en Altman y Dittmer, 1961, Obstétrique : 5, 252, 1900
- MITCHELL, M.H.; HAMILTON, T.S.; SEGGERDA, F.R. & BEAN, H.W.
The chemical composition of the adult human body and its bearing on the biochemistry of growth. J. Biol. Chem. : 158, 625, 1945
- MOGHISSI, A.A.; KELLEY, H.L.; REGNIER, J.E. & CARTER, M.W.
Low-level counting by liquid scintillation. Tritium measurement in homogeneous systems. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 20, 145, 1969
- MOORE, F.D.
Determination of total body water and solids with isotopes. Science : 157, 1946
- MOORE, F.D.
Further observations on TBW II: Changes of body composition in disease. Surg. Gyn. Obst.: 95, 155, 1952
- MOORE, F.D.
Body Composition: An introduction to the clinical and investigative use of isotope dilution methods. p. 452 en "RadioIsotopes in Medicine" G.A. Andrews, M. Bracer and E.S. Anderson (Eds.) U.S.A.E.C. Div. Tech. Inf., U.S. Gov. Printing Office, Wash. D.D., 1955
- MOORE, F.D.; McMURRAY, J.D.; PARKER, H.V. & MAGNUS, I.C.
Body Composition: Total body water and electrolytes, Intravascular and Extravascular phase volumes. Metabolism : 5, 447, 1956

- MOORE, F.D.; OLESEN, K.H.; McMURREY, J.D.; PARKER, H.V.
 BALL, M.R. & BOYDEN, C.M.
 The body cell mass and its supporting environment:
 Body composition in health and disease. W.B.
 Saunders Co. Philadelphia-London, 1963
- MOORE, F.D.; LISTER, J.; BOYDEN, C.M.; BALL, M.R.; Sul-
 LIVAN, N. & DAGHER, F.J.
 The skeleton as a feature of body composition:
 Values predicted by isotope dilution and observed
 by cadaver dissection in an adult human female.
 Human Biology : 40, 135, 1968
- MOORE, F.D.; HARTSUCK, J.M.; ZOLLINGER, R.M. & JOHNSON, J.E.
 Reference models for clinical studies by isotope
 dilution. Ann. Surg. : 168, 671, 1968
- MOSS, G.J.
 Scintillation counting of plasma tritiated water.
 J. Lab. Clin. Med. : 63, 315, 1964
- NEUMAN, W.F. & NEUMAN, M.W.
 Emerging concepts of the structure and metabolic
 functions of the bone. Amer. J. Med. : 22, 123,
 1957
- NEWMAN, E.V.; BORDLEY, J. & WINTERITZ, J.
 The interrelationships of glomerular filtration
 rate (mannitol clearance) extracellular fluid volume,
 surface area of the body and plasma concentration
 of mannitol. Bull. Johns Hopkins Hosp. : 75,
 253, 1944
- NICHOLS, G.Jr.; NICHOLS, N.; WEIL, W.B. & WALLACE, W.M.
 The direct measurement of the extracellular phase
 of tissues. J. Clin. Invest. : 32, 1299, 1953
- NOKES, M.C.
 Radioactivity measurement instruments. A guide
 to their construction and use. Heinemann, London.
 1958
- NOONEY, G.C.
 Mathematical Models. Reality and results. J.
 Theoret. Biol. : 9, 239, 1965
- NOORDHOEK, J.
 Apparent failure of the two compartment open model
 in describing the pharmacokinetics of intravenous-
 ly injected hexobarbital in mice. Arch. Int. Pharm-
 acodyn. Ther. : 189, 388, 1971

- NOVAK, I.P.
Total body water in man. En "Compartments, pools and spaces in Medical Physiology" Berguer y Lushbaugh, 1967, p.197
- NUCLEAR-CHICAGO
Preparation of samples for liquid scintillation counting. Nuclear-Chicago Co., Des Plaines, 1967
- O'KELLEY, G.D.
Detection and measurement of nuclear radiation. National Academy of Science. Nat'l Research Council Report NAS-NS, 3105, 1962
- OKITA, G.T.; KABARA, H.; RICHARDSON, F. & LEROY, G.V.
Assaying compounds containing H^3 and C^{14} . Nucleonics : 15, 111, 1957
- OLIVERIO, V.T. & DAVIDSON, J.D.
Liquid scintillation counting of urine. J. Pharmacol. and Exptl. Therapeutics : 137, 76, 1962
- OSBORNE, R.V.
Absorption of tritiated water vapour by people. Health Phys. : 12, 1527, 1966
- OSSERMAN, E.F.; PITTS, G.C.; WELHAM, W.C. & BEHNKE, A.R.
In vivo measurement of body fat and body water in a group of normal men. J. Appl. Physiol. : 2, 633, 1950
- OTT, D.G.
Chemistry of the counting sample: Scintillation solutes. BELL & HAYES (Referencia 2) pp.105-107
- OVERMAN, R & CLARK, H.M.
Radioisotope Techniques, MacGraw Hill, New York, 1960
- OVERMAN, R.
Sodium, potassium and chloride alterations in disease. Physiol. Rev. : 31, 285, 1951
- OWEN, R.B.
Scintillation Counters: A survey. Nuclear Power : 5, 82, 1960
- OWEN, G.; KERRY, R.J. & DAVIES, H.M.
Total body water and weight changes in normal adults. Nature : 221, 471, 1969

- PACE, N. KLINE, L.; SCHACHMAN, H.K. & HARFENIST, M.
Studies of body composition, IV: Use of radioactive hydrogen for measurement in vivo of Total Body Water.
J. Biol. Chem. : 168, 459, 1947
- PAERICH, H.
Body water determination in man by means of tritium.
Pflüger Arch. Ges. Physiol. : 281, 374, 1964
- PAPPENHEIMER, J.R.
Passage of molecules through capillary walls. Physiol. Rev. : 33, 387, 1953
- PAPPENHEIMER, J.R.; RENKIN, E.M.; & BORRERO, L.M.
Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. Amer. J. Physiol. : 167, 12, 1951
- PARMENTIER, J.H. & TEN, HAAF, F.E.L.
Developments in liquid scintillation counting since 1963. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 20, 305, 1969
- PARSONS, D.H.
Biological problems involving sums of exponential functions of time. An improved method of calculation. Math. Biosc. : 9, 37, 1970
- PASSMORE, R. & DRAPER, M.A.
The chemical anatomy of human body. en "Biochemical disorders in human diseases" R.H.S. Thompson & E.J. KING (Eds.) 2nd. Ed. p.10 Churchill, London, 1964
- PATEL, M.
A least-squares approach to the solution of a non-linear model. J. Pharmacol. Exp. Ther. : 174, 379, 1970
- PAUL, W.M.; ENNS, M.T.; REYNOLDS, S.R.M. & CHINARD, F.P.
Sites of water exchange between maternal system and amniotic fluid of rabbits. J. Clin. Invest. : 35, 634, 1956
- PAYNTER, H.M. (Ed.)
A palimpsest on the electronic analog art. G.A. Philbrick Researches, Inc. Boston, Mass. 1955
- PEDRAZA, V.
Formulación, desarrollo y análisis de modelos matemáticos de sistemas biológicos y su aplicación al estudio de la función y de la circulación renal en el hombre. Tesis Doctoral, Fac. Medicina, Madrid 1972

PENG, G.T.

Quenching of fluorescence in liquid scintillation counting of labeled organic compounds. Anal. Chem. : 32, 1291, 1960

PENG, C.T.

Computation of channels ratio in liquid scintillation counting. Theoretical consideration. Anal. Chem.: 41, 16, 1969

PERL, W.

A method for curve-fitting by exponential functions. Intern. J. Appl. Rad. Isotopes : 8, 211, 1960

PIERSON, W.R. & EAGLE, E.L.

Nomogram for estimating body fat, specific gravity and Lean Body Weight. Aerosp. Med. : 40, 2, 1969

PINAUD, N.; SERRES, L. & COMMANAY, L.

Addition d'Eau a des Scintillateurs contenant du Dioxanne et du Toluene. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes; 19, 369, 1968

PINSON, E.A.

Water exchanges and barriers as studied by the use of hydrogen isotopes. Physiol. Rev. : 32, 123, 1952

PINSON, E.A. & ANDERSON, E.C.

³ H absorption, distribution and excretion of tritium in man and animals. Amer. J. Physiol. : 163, 741, 1950

PINSON, E.A. & ANDERSON, E.C.

AEC Document LA 1218 1-29, March, 1951 (Citado en Pinson y Langham, 1957).

PINSON, E.A. & LANGHAM, W.H.

Physiology and toxicology of tritium in man. J. Appl. Physiol.: 10, 108, 1957

PORGESS, K.G.

Note on the S^2/B Criterion of quality for counting equipment. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 19, 711 1968

PRENTICE, T.C.; SIRI, W.; BERLIN, N.I.; HYDE, G.M.; PARSONS, R.J.; JOINER, E.E. & LAWRENCE, J.H.

Studies of Total Body Water with Tritium. J. Clin. Invest. : 31, 412, 1952

PRINGSHEIM, P.

Fluorescence and Phosphorescence. Interscience Publishers Inc., New York, 1949

PUTMAN, J.L.

On counting precision and the S^2/B criterion
Int. J. Appl. Rad. Isotopes. : 20, 205, 1969

RADIOCHEMICAL CENTRE

The radiochemical manual, 2nd Ed.
The Radiochemical Ctr. ; Amersham , 1966

RAPKIN, E.

Hydroxide of hyamine 10-X.
Packard Techn. Bull. 3, June, 1961

RAPKIN, E.

Sample preparation for liquid scintillation counting, I, Solubilization techniques
Digitechniques, Intertechnique; Paris, 1969

RAPKIN, E & GIBBS, J.A.

Polyethylene containers for liquid scintillation spectrometers
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 14, 71, 1963

RAPKIN, E.

Temperature control in liquid scintillation counting
Digitechniques , Intertechniques; Paris, 1968

RAPKIN, E.

Liquid scintillation counting 1957-63, A review
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 15, 69, 1964

RATHBUN, E.N. & PACE, N.

The determination of total body fat by means of the body specific gravity
J. Biol. Chem. : 158, 667, 1945

RAUH, J.H. & SCHUMKY, D.A.

Lean and non lean body mass estimator in inban school children . En: "Human growth, body composition , citology, energy, and intelligence ; Cheek, D.B. ed."
Lea and Febiger; Philadelphia, 1968

REASER, P.B. & BURCH, G.E.

Determination of D2O in water by measurement of freezing point
Science : 128, 415, 1958

RENKIN, E.M.

Effects of blood flow on diffusion kinetics in isolated perfused hindlegs of cats
Amer. J. Physiol. : 183, 125, 1955

- RESCINGNO, A. & SEGRE, G.
Drug & tracer kinetics
Blaisdell; New York, 1966
- RICHMOND, C.R.; TRUJILLO, T.T. & MARTIN, D.W.
Volume and turnover of body water in *Dipodomys desertii* with tritiated water
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. : 104, 9, 1960
- RICHMOND, C.R.; LANGHAM, W.H. & TRUJILLO, T.T.
Comparative metabolism of tritiated water by mammals
J. Cell. Comp. Physiol. : 59, 45, 1962
- RIGGS, D.S.
Quantitative aspects of iodine metabolism in man
Pharmacol. rev. : 4, 284, 1954
- RIGGS, D.S.
The mathematical approach to physiological problems
M.I.T. Press; Cambridge, Mass and London, 1970
- ROBERTSON, J.S.
Theory and use of tracers in determining transfer rates in biological systems
Physiological Rev. : 37, 133, 1957
- ROBERTSON, J.S.
The use of analog computers in the kinetic analysis of compartmented systems
Trans. N.Y. Acad. Sci. : 23, 506, 1961
- ROBERTSON, J.S.
"Mathematical treatment of uptake and release of indicator substances in relation to flow analysis in tissues and organs . En "Handbook of Physiology ; Hamilton W.F. and Dow, P. eds. Vol. I Sect. 2, Chapt. 19, p. 617"
American Physiological Society ; Washington D.C. 1962
- ROBERTSON, J.S.; TOSTESON, D.C. & GAMBLE, J. L.
Determination of exchange rates in three-compartment steady state closed systems through the use of tracers
J. Lab. Clin. Med. : 49, 497, 1957
- ROGERS, A.W. & MORAN, J.F.
Evaluation of quenching correction in liquid scintillation counting, by internal, automatic, external and channels ratio standardization methods
Anal. Biochem. : 16, 206, 1966

- ROLLINSON, E. & ROTBLAT, J.
An electrical analogue of the metabolism of iodine in the human body
Brit. J. Radiol. : 28, 191, 1955
- ROSENBERG, T.
Concept and definition of active transport. En :
"Active transport and secretion"
Acad. Press; New York, 1954, p. 27
- ROSENBERG, T. WILBRAND, T
Kinetics of membrane transports involving chemical reactions
Exp. Cell. Research : 9, 49, 1955
- RUBINOW, S.I. & WINZER, A.
Compartment Analysis : An inverse problem
Math. Biosc. : 11, 203, 1971
- SACKS, J.
Isotopic tracers in Biochemistry and Physiology
McGraw-Hill; N.Y., 1958
- SCALES, B.
Liquid scintillation counting: the determination of background counts of samples containing quenching substances
Anal. Biochem. : 5, 489, 1963
- SCHAIN, R.J.
Cerebrospinal fluid and serum cation levels
Arch. Neur. : 11, 330, 1964
- SCHOERB, P.R.; FRIIS-HANSEN, B.J.; EDELMAN, I.S. ;
SOLOMON, A.K. & MOORE, F.D.
The measurement of total body water in the human subject by deuterium oxide dilution with a consideration of the dynamics of deuterium distribution
J. Clin. Invest. : 29, 1296, 1950
- SCHLOERB, P.R.; FRIIS-HANSEN, B.J.; EDELMAN, I.S. ;
SHELDON, D.B. & MOORES, F.D.
The measurement of deuterium oxide in body fluids by the falling drop method
J. Lab. Clin. Med. : 37, 653, 1951
- SCHOENHEIMER, R.
The dynamic state of body constituents
Harvard Univ. Press; Cambridge, Mass, 1942
- SCHWARTZ, S.L.; NELSON, A.; WEISZ, P.; MAXWELL, M.H.;
BREED, E. & SILVER, L.
Citado en Altman y Dittmer (1961)
Proc. Balt. : 11, 142, 1952

- SCRIBANTE, P.; MAURICE, P & FAVARGER, P.
Citado en Altman y Dittmer, (1961)
Helvet. Physiol. Pharm. Acta : 10, 224, 1952
- SEKEL, J.P.; TAIT, G.R. & NATHANSON, N.
Studies of dye dilution curves using a digital computer
Biomed. Eng. : 13, 32, 1966
- SELIGER, H.H.
Improvement of liquid scintillator response. En:
"Liquid scintillation counting; Bell and Hayes eds
Pergamon Press; New York, 1958
- SEITCHICK, J.
Changes in body contents of water and electrolytes during pregnancy: A cross-sectional study.
Obstet, Gynecol. N.Y. : 29, 155, 1967
- SEICHICK, J.; ALPER, C. & SZUTKA, A.
Changes in body compositions during pregnancy
Ann. New York, Acad. Sci. : 110, 821, 1963
- SHARPE, J.
Nuclear Radiation Detectors 2nd ed, Methuen, London, 1964
- SHARPE, J. & STANLEY, V.A.
Photomultipliers for tritium counting. Tritium in the physical and biological sciences, Vol.I
I.A. E.D. Viena, 1962, p.211
- SHARPE, J. & THOMSON, E.E.
Photomultiplier tubes and scintillation counters
Proceedings of the Second United Nations International Conference in the Peaceful Uses of Atomic Energy : 14, 311; Geneva, 1958
- SHEPPARD, C.W.
Theory of the study of transfer within a multi-compartment systems using isotopic tracers
J. Appl. Physiol. : 19, 70, 1948
- SHEPPARD, C.W.
Basic principles of the tracer method
John Wiley & Son ; New York, 1962
- SHEPPARD, C.W.
Stochastic models for tracer experiments in the circulation III The lumped catenary system
J. Theort. Biol. : 33, 491, 1971

- SHEPPARD, C.W.
Stochastic models for tracers experiments in the circulation, I Parallel random walks
J. Theoret. Biol. : 2, 33, 1962
- SHEPPARD, C.W. & UFFER, M.B.
Stochastic models for tracer experiments in the circulation II Serial random walks
J. Theoret. Biol. : 22, 188, 1969
- SIRI, W.E.
Body composition from fluid spaces and density. Analysis of methods
Donner Laboratory of Biophysics and Medical Physics UCRL-3349, 1956
- SIRI, W.E.
Theory of tracer methods. En: "Isotopic tracers and nuclear radiations"
McGraw-Hill; New York, 1949
- SJÖSTRAND, T.
En "Handbook of Physiology , Hamilton and Dowds , Vol. I, Sect 2 , Chapt. 3, p.51"
American Physiological Society , Washington D.C. 1962
- SKINNER, S.M.; CLARK, R.E.; BAKER, N. & SHIPLEY, R.A.
Complete solution of the three compartment model in a steady state after single injection of radioactive tracer
Amer. J. Physiol. : 196, 238, 1959
- SLACK, L & WAY, K.
Radiations from radioactive atoms in frequent use
USAEC Rep. Feb. 1959
- SOLOMON, A.K.
Compartmental methods of kinetic analysis, En: "Mineral Metabolism, C.L. Comar, C. and Bronner, F.eds. "
Acad. Press; New York, 1960 , Vol. I ,A
- SOLOMON, A.K.
Potassium transport in human erythrocytes: evidence for a three-compartment system
J. Gen. Physiol. : 38, 371, 1955
- SNELL, A.H. (ed)
Nuclear instruments and their uses, Vol I
John Wiley ; New York, 1962

- SNYDER, W.S.; FISH, B.R.; BERNARD, S.R.; FORD, M.R. & MUIR, J.R.
Urinary excretion of tritium following exposure of man to HTO : a two exponential model
Phys. Med. Biol. : 13, 547, 1968
- SOBERMAN, R.J.
A comparison of TBW as determined by antupyrine and desiccation in rabbits
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. : 71, 172, 1949
- SOBERMAN, R.J.; BRODIE, B.B.; LEVY, B.B.; AXELROD, J. HOLLANDER, V. & STEELE, J.M.
The use of antipyrine in the measurement of total body water in man
J. Biol. Chem. : 179, 31, 1949
- SODD, V.J. & SCHOLZ, J.L.
Analysis of tritium in water : A collaborative study
J. Assoc. Offic. Anal. Chemist. : 52, 90, 1969
- SOLOMON, A.K.; EDELMAN, I.S. & SOLOWAY, S.
The use of the mass spectrometer to measure deuterium in body fluids
J. Clin. Invest. : 29, 1311, 1950
- SØNDERGAARD, W. & STRANDE, C.S.
Diurnal variations in extracellular fluid volume in man detected by constant infusion technique
Scand. J. Clin. Lab. Invest. : 25, 65, 1970
- SPRATT, J.L.
The current status of liquid scintillation counting
Grune and Stratton ; London, 1970
- SPRINGELL, P.M.
Inadequacy of an external standard in correcting for quenching in liquid scintillation counting of tritiated water in biological material
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 20, 743, 1969
- STACY, R.W.
Computers: analog in "Medical Physics, Glasser O. ed. Vol. III p. 193
Yr. BK. Pub.; CHICAGO, 1960
- STEELE, J.M.
Body water
Am. J. Med. : 9, 141, 1950

- SNYDER, W.S.; FISH, B.R.; BERNARD, S.R.; FORD, M.R. & MUIR, J.R.
Urinary excretion of tritium following exposure of man to HTO : a two exponential model
Phys. Med. Biol. : 13, 547, 1968
- SOBERMAN, R.J.
A comparison of TBW as determined by antipyrine and desiccation in rabbits
Proc. Soc. Exp. Biol. N.Y. : 71, 172, 1949
- SOBERMAN, R.J.; BRODIE, B.B.; LEVY, B.B.; AXELROD, J. HOLLANDER, V. & STEELE, J.M.
The use of antipyrine in the measurement of total body water in man
J. Biol. Chem. : 179, 31, 1949
- SODD, V.J. & SCHOLZ, J.L.
Analysis of tritium in water : A collaborative study
J. Assoc. Offic. Anal. Chemist. : 52, 90, 1969
- SOLOMON, A.K.; EDELMAN, I.S. & SOLOWAY, S.
The use of the mass spectrometer to measure deuterium in body fluids
J. Clin. Invest. : 29, 1311, 1950
- SØNDERGAARD, W. & STRANDE, C.S.
Diurnal variations in extracellular fluid volume in man detected by constant infusion technique
Scand. J. Clin. Lab. Invest. : 25, 65, 1970
- SPRATT, J.L.
The current status of liquid scintillation counting
Grune and Stratton ; London, 1970
- SPRINGELL, P.M.
Inadequacy of an external standard in correcting for quenching in liquid scintillation counting of tritiated water in biological material
Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 20, 743, 1969
- STACY, R.W.
Computers: analog in "Medical Physics, Glasser O. ed. Vol. III p. 193
Yr. BK. Pub.; CHICAGO, 1960
- STEELE, J.M.
Body water
Am. J. Med. : 9, 141, 1950

- STEELE, J.M.; BERGER, E.Y.; DUNNING, M.F.; BRODIE, B.B. & KLEIN, E.
Total body water in man
Am. J. Physiol. : 162, 313, 1950
- STEPHENSON, J.L.
Theory of transport in linear biological systems
I. Fundamental integral equation
Bull. Math. Biophysics : 22, 1, 1962
- STRAJMAN, E.; BERLIN, N.E.; ELMLINGER, J.P. & ROBINSTON O.
The pattern of mixing within the circulatory system of man; the use of a single intravenous injection of substances non diffusible into the interstitial fluid.
Acta Med. Scand. : 157, 263, 1957
- SUGARMAN, R.M. & POTTER, D.W.
A biological and medical analogue computer
Citado por Roberston J.S., Trans N.Y. Acad. Sci. 23, 506, 1961
- SWANK, R.K.
Characteristics of scintillators
Am. Rev. Nucl. Sci. : 4, 111, 1954
- SWANK, R.K.
Recent advances in theory of scintillation
Phosphors
Nucleonics : 12, 14, 1954
- SWANK, R.K.
Limits of sensivity of liquid scintillation couhters. En: "Liquid scintillation counting, Bell y Hayes eds. p. 23-38"
Pergamon Press Inc.; New York, 1958
- SWEET, N.J.; NADELL, J. & EDELMAN, I.S.
Gastrointestinal water and electrolytes III The equilibration of radiobromide in gastrointestinal contents and the proportion of exchangeable chloride in the gastrointestinal tract
J. Clin. Invest. : 36, 279, 1957
- TAIT, M. J.
Water in biological systems
Nature : 230, 91, 1971
- TALSO, P.J.; LAHR, T.N.; SPAFFORD, N.; FERENZI, G & Jackson, H.R.
A comparison of the volume of distribution of antipiryn, N-acetyl 4 amino antipiryn, and ¹³¹I labeled 4-iodo-antipiryn in human beings
J. Lab. Clin. Med. : 46, 619, 1955

- TAYLOR, D.
The measurement of radioisotopes, 2nd ed.
Methuen; London 1967
- THOMPSON, R.C.
Studies of metabolic turnover with tritium as a tracer I. Gross studies on the mouse
J. Biol. Chem. : 197, 81, 1952
- THOMPSON, R.C.
Studies of metabolic turnover with tritium as a tracer .II Gross studies on the rat
J. Biol. Chem. : 200, 731, 1953
- THORTON, V. & CONDON, F.E.
Infrared spectrometric determination of D2O in water
Anal. Chem. : 22, 690, 1950
- TOATES, F.M.
Computer stimulation of thirst and water balance
Med. Biol. Eng. , 1970
- TOTHILL, P.
Measurement techniques for the clinical application of radioisotopes.
RCC, Med. Monograph, nº 2, Radiochemical Ctr.
Amersham , 1966
- TURNER, J. C.
Sample preparation for liquid scintillation counting
Rev. 6, The Radiochemical Ctr. , Amersham , 1967
- VAN DER DOES DE BYE , J.A.W.
The scintillation counter, Philips Techn. Rev:
20, 209, 1959
- VENNART, J.
Radiotoxicology of tritium and ^{14}C compounds
Health Phys. : 16, 429, 1969
- VOLKMANN, A. M.
Hanbuch der Physiologie. Citado por Voit , Vol 6
p.345; Leipzig, 1881
- WALLACE, V.M.
Some aspects of the chemical composition , physiology and pathology of intracellular fluid
Pediatrics : 9, 141, 1952
- WALSER, M.
Extracellular fluid in individual tissues in relation to extracellular fluid in the body as a whole
U.S.A.E.C. Symposium nº 10, 1967

- WALSER, M. SELDIN, D.W. & GROLLMAN, A.
An evaluation of radiosulphate for the determination of the volume of extracellular fluid in man and dogs
J. Clin. Invest. : 32, 299, 1953
- WASHTELL, C.C.H.
An introduction to radiation counters and detectors
Newness; London, 1958
- WEINBERGER, D & PORTER, J.W.
Metabolism of hydrogen isotopes by rapidly growing *Chlorella pyrenoidosa* cells
Arch. Biochem. : 50, 160, 1954
- WERBIN, H; CHAIKOFF, L & IMADA, M.R.
Rapid sensitive method of determining ^3H -water in body fluids by liquid scintillation spectrometry
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. : 102, 8, 1959
- WHITE, R. D.
An assessment of the efficiencies and costs of liquid scintillation mixes for aqueous tritium samples
Int. J. Appl. Radiat, Isotopes : 19, 49, 1968
- WHIPPLE, H.E.
Multicompartmental analysis of tracer experiments
Ann. N.Y. Acad. Sci. : 108, 1, 338, 1963
- WHIPPLE, H.E. (ed)
Computation for cardiovascular research
Ann. N.Y. Acad. Sci. : 126, 681, 1965
- WIDDOWSON, E.M.
Citado en Atlman y Dittmer (1961)
Arch. Dis. Childh. : 26, 205, 1951
- WIDDOWSON, E.M.; McCANCE, R.A. & SPRAY, C.M.
Studies on total body water by dessication of cadavers
Clin. Sc. London : 10, 113, 1951
- WILKINSON, D.H.
Ionization chambers and counters
University Press , Cambridge , 1950
- WILMORE, J.M. & BEHNKE, A. R.
Predictability of lean body weight through anthropometric assessment in college men
J. Appl. Physiol. : 25, 349, 1968

WILLIAMS, M.A.; COPE, G.H.; JACKSON, J.L. & HILL, P
Liquid scintillation spectrometer data processing
by desk-top computer
Biochem. J. : 118, 379, 1970

WRENSHALL, G.A.
Working bases for tracer measurements of transfer rates of a metabolic factor in biological systems containing compartments whose contents do not intermix rapidly
Canad. J. Biochem. Physiol. : 33, 909, 1955

ZADEH, L.A; & DESOER, C.A.
Linear system theory
McGraw-Hill; New York , 1963

ZILVERSMIT, D.B.
The design and analysis of isotope experiments
Amer. J. Med. 29, 832, 1960

ZILVERSMIT, D.B. ; ENTENMAN, C. & FISHLER, M.C.
J. Gen Physiol. : 26, 325, 1943

BARBER, H.E.; BOURNE, G.R. & BUCKLEY, G.A.

A simple method for complete processing of data from Liquid Scintillation Counters. J. Physiol. : 219, 4P, 1971

CARROLL, C.O. & HOUSER, T.J.
Liquid Scintillation Counting data analysis and computers. Int. J. Appl. Radiat. Isotopes : 21, 261, 1970

PINSON, E.A.
Water exchanges and barriers as studied by the use of hydrogen isotopes. Physiol. Rev. : 32, 123, 1952